

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Der Einfluss von Sexualhormonen auf die Integrinexpression
und Interleukin-6 Produktion synovialer Fibroblasten
bei Rheumatoider Arthritis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Weiß
2012

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Der Einfluss von Sexualhormonen auf die Integrinexpression
und Interleukin-6 Produktion synovialer Fibroblasten
bei Rheumatoider Arthritis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Weiß
2012

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Susanne Grässel

Tag der mündlichen Prüfung:

26.03.2013

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CCP	cyclisches citrulliniertes Peptid
CD	cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
Cy5	Carbocyanin 5
CV	Variationskoeffizient
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPN	Diarylpropionitril
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Östrogenrezeptor
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GMean	geometrisches Mittel
GPR	G-protein coupled receptor
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	human leukocyte antigen
HRE	hormone response element
HRP	Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JAK	Janus kinase
kDa	Kilodalton
M	Molarität
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrixmetalloproteinase
MAP	mitogen-activated protein
NF-κB	nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OA	Osteoarthritis
OASF	synoviale Fibroblasten von OA Patienten
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPT	Propylpyrazoltriol
RA	rheumatoide Arthritis
Ras	Rat sarcoma
RASF	synoviale Fibroblasten von RA Patienten
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCID	severe combined immunodeficiency
SERM	selektiver Östrogenrezeptormodulator
SF	synoviale Fibroblasten
SSC	sideward scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
SUMO-1	small ubiquitin-like modifier 1
TH	T-Helfer
TMB	Tetramethylbenzidin
TMR	Transmembranrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	vascular cellular adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Klinisches Krankheitsbild/ Definition	1
1.2 Ätiologie	3
1.3 Pathogenese.....	4
1.3.1 Die Rolle der synovialen Fibroblasten (SFs)	4
1.3.2 Grundsätzliches zur Funktion der Integrine	6
1.3.3 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Osteoarthritis (OA) und rheumatoider Arthritis.....	7
1.4 Der Einfluss von Sexualhormonen auf die RA	8
1.4.1 Hintergrund	8
1.4.2 ICI 182,780, herkömmliche Östrogenrezeptoren und GPR30 (G-protein coupled receptor 30).....	13
1.5 IL-6 als Schlüsselzytokin in der Entstehung der RA.....	14
1.5.1 Biologie und Rezeptoraktivierung.....	15
1.5.2 Die Wirkung von IL-6 auf Gelenkebene	16
1.5.3 Die Rolle von IL-6 bei der erworbenen Immunantwort.....	17
1.5.4 Der Einfluss von IL-6 auf die Entwicklung systemischer Symptome der RA	17
1.5.5 Die Blockierung des IL-6 Rezeptors in der Behandlung der RA	18
1.6 Ziel der Arbeit	18
2 Materialien und Methoden.....	19
2.1 Patienten.....	19
2.2 Präparation des Synovialgewebes und der Fibroblasten	20
2.3 Zellkultur	21
2.3.1 Medien und Lösungen	21
2.3.2 Zellkultivierung.....	22
2.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	23
2.4 Stimulation von RA und OA Fibroblasten	24
2.5 Durchflusszytometrie (FACS) zur Messung der Integrinexpression.....	24
2.5.1 Stimulation der Zellen	25
2.5.2 Antikörperfärbung und Fixierung.....	26
2.5.3 Ausmessen mittels Durchflusszytometer/FACS-Analyse.....	28
2.5.4 Auswertung der Messdaten	29
2.6 ELISA zur Bestimmung der IL-6 Ausschüttung nach Stimulation.....	32
2.6.1 Präparation/Vorbereitung der synovialen Fibroblasten.....	32
2.6.2 Durchführung des ELISA	32
2.7 Statistische Analyse.....	36
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Dihydrotestosteron	37
3.1.1 FACS-Analyse des Einflusses von Dihydrotestosteron auf die Integrinexpression synovialer Fibroblasten von OA und RA Patienten im Vergleich.....	37
3.1.2 Untersuchung der IL-6 Produktion von OASF und RASF mittels ELISA nach Stimulation mit DHT	44
3.1.3 Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion	45
3.2 Progesteron	46
3.2.1 FACS-Analyse des Einflusses von Progesteron auf die Integrinexpression synovialer Fibroblasten von OA und RA Patienten im Vergleich.....	46

3.2.2	Untersuchung der IL-6 Produktion von OASF und RASF mittels ELISA nach Stimulation mit Progesteron.....	52
3.2.3	Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion.....	53
3.3	17β-Estradiol und ICI 182, 780	54
3.3.1	FACS-Analyse des Einflusses von 17 β -Estradiol, 17 β -Estradiol in Kombination mit ICI 182, 780 und ICI 182, 780 auf die Integrinexpression synovialer Fibroblasten von OA und RA Patienten im Vergleich	54
3.3.2	Untersuchung der IL-6 Produktion von OASF und RASF mittels ELISA nach Stimulation mit 17 β -Estradiol.....	60
3.3.3	Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion.....	61
4	Diskussion.....	62
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	73
	Literaturverzeichnis.....	74
	Selbstständigkeitserklärung	86
	Danksagung	87

1 Einleitung

1.1 Klinisches Krankheitsbild/ Definition

In den industrialisierten Ländern dieser Welt haben Veränderungen der Lebensgewohnheiten und eine Verbesserung der Hygienebedingungen zu einem Wechsel im Spektrum der zu verzeichnenden Erkrankungen geführt. Während es auch dank des medizinischen Fortschritts gelang, Infektionskrankheiten mehr und mehr zurückzudrängen, ist bei Autoimmunerkrankungen eine stetige Zunahme zu beobachten. Dabei ist es unklar, ob ein tatsächlicher Anstieg dieser Erkrankungen besteht, oder ob vielmehr das wachsende Krankheitsbewusstsein und bessere diagnostische Möglichkeiten dafür verantwortlich sind.¹ In diesem Zusammenhang spielt auch die Rheumatoide Arthritis (RA) eine bedeutende Rolle.

Untersuchungen zur Häufigkeit der RA ergaben, dass weltweit ca. 0,5 bis 1 % der Bevölkerung an dieser Erkrankung leiden.² An einer RA können Männer wie Frauen erkranken, allerdings sind etwa dreimal mehr Frauen davon betroffen.³ Die Krankheit tritt praktisch in jedem Alter auf, am häufigsten entwickeln sich die Beschwerden jedoch zwischen dem vierten und fünften Lebensjahrzehnt.⁴

Die traditionellen Begriffe Rheuma und Rheumatismus wurden erstmals im Liber de Rheumatismo et Pleuritide dorsali von Guillaume de Baillou (1538 – 1616) verwendet.⁵ Seine Vorstellung zum pathogenetischen Prinzip nach der damaligen Lehre der Humoralpathologie war, dass kalter Schleim („Phlegma“) vom Gehirn herab zu den Extremitäten fließe und dort infolge einer veränderten Zusammensetzung der Säfte (Dyskrasie) die entsprechenden Beschwerden auslöse.

Heute werden unter der Bezeichnung „Rheumatischer Formenkreis“ etwa 400 verschiedene Krankheitsentitäten zusammengefasst. Dazu gehören entzündlich-rheumatische Erkrankungen wie die RA, degenerativ-rheumatische wie die Arthrose sowie weichteilrheumatische Erkrankungen, zu denen unter anderem die Polymyalgia rheumatica zählt. Daneben gibt es noch die Gruppe der Stoffwechselstörungen, die mit rheumatischen Beschwerden einhergeht, z. B. Gicht und Osteopenie.

Als häufigste entzündliche Erkrankung der Gelenke befällt die RA bevorzugt die synovialen Strukturen der körperfernen Gelenke der Hände und Füße. Typischerweise sind Handwurzelknochen, Fingergrundgelenke und proximale Interphalangealgelenke

betroffen. Ein symmetrisches Auftreten ist ebenfalls charakteristisch, allerdings nicht zwingend für die Diagnosestellung erforderlich.

Die durch ihren schubweisen Verlauf gekennzeichnete Erkrankung führt allmählich zu einem Befall weiterer Gelenke (Polyarthrit) und einer fortschreitenden Gelenkverformung und -zerstörung, einhergehend mit einer zunehmenden Ulnardeviation der Hände sowie einer Schwanenhals- (Hyperextension der proximalen bei gleichzeitiger Flexion der distalen Interphalangealgelenke) und Knopflochdeformität (Beugung der proximalen bei gleichzeitiger Streckung der distalen Interphalangealgelenke) der Finger (siehe Abb. 1.1).



Abb. 1.1: Klinische Manifestationen der Rheumatoiden Arthritis im Endstadium

Zunehmende Gelenkverformungen im Endstadium der Rheumatoiden Arthritis führen zu starken Bewegungseinschränkungen. Ulnardeviation, Schwanenhals- und Knopflochdeformität sind Resultat eines Kräfteungleichgewichts von Muskeln und Sehnen an den betreffenden Gelenkseiten. Auf diese Weise kommt es zur Achsabweichung der knöchernen Strukturen.

Quelle: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/images/ency/fullsize/17130.jpg>

Die RA ist allerdings keine reine Gelenkerkrankung, sie ist eine systemische Autoimmunerkrankung mit immungenetischer Disposition. Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, erhöhte Temperaturen und Dysästhesien können dabei mehr oder weniger stark ausgeprägt sein, vereinzelt kann es auch zu einer Organbeteiligung (Auge, Haut, Gefäße, Lunge, Herz, Niere, Gastrointestinaltrakt) kommen. So finden sich beispielsweise bei etwa 10 bis 20 % der Betroffenen insbesondere an druckbelasteten Körperstellen derbe, schmerzlose Knoten unter der Haut, sogenannte Rheumaknoten. In äußerst seltenen Fällen treten lebensbedrohliche Komplikationen wie eine Perikarditis oder Pleuritis auf.

Auch wenn es nur sehr selten zu akut lebensbedrohlichen Situationen bei RA Patienten

kommt, führt diese Erkrankung neben einer Einschränkung der Mobilität und Beweglichkeit (sowie einer damit einhergehenden Verringerung der Lebensqualität) zu einer Reduktion der Lebenserwartung.⁶ Je nach Studiendesign, geographischer Lokalisation, Stadium und Aktivität der Erkrankung sowie Sorgfalt bei der Nachsorge variierte die Mortalitätsratio in verschiedenen epidemiologischen Studien verglichen mit der Allgemeinheit zwischen 1,28 und 2,98.^{7,8} Neuere Studien konnten auch zeigen, dass die Lebenserwartung von RA Patienten im Verhältnis zur Normalbevölkerung in den letzten Jahren weniger stark angestiegen ist und sich damit die bestehende Lücke noch vergrößert hat.⁹ Die Hauptursache hierfür ist wohl das vermehrte Auftreten von Arteriosklerose bei RA und das hiermit assoziierte erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse.⁶

Obwohl sich in den letzten Jahren eine Verbesserung der Therapielangzeitergebnisse bei einem Teil der Patienten in Bezug auf Gelenksdeformierungen, funktionelle Einschränkungen, Arbeitsunfähigkeit und Mortalitätsrisiko gezeigt hat¹⁰, ist es notwendig einem noch größeren Patientenkollektiv die bestmögliche Therapie zukommen zu lassen und nach immer neueren und suffizienteren Optionen im Sinne einer Nutzen-Risiko-Abwägung zu suchen.

1.2 Ätiologie

Die Ursachen der Erkrankung sind bislang weitgehend ungeklärt. Es wird gemeinhin angenommen, dass eine individuelle genetische Prädisposition, Umweltfaktoren (möglicherweise infektiöse Agenzien) und eine dysregulierte Immunantwort eine Rolle spielen.¹¹⁻¹⁴

Eine fehlregulierte adaptive Immunantwort kann der klinischen Manifestation der Erkrankung dabei um Jahre vorausgehen. Eine wiederholte Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt vermutlich irgendwann zu einem Zusammenbruch der Toleranz.¹⁵ Krankheitsauslösend können, so eine wissenschaftliche Hypothese, Viren (Parvovirus B19, EBV, Retroviren) und Bakterien (Mycoplasmen, Mycobakterien, Enterobakterien) sein, ähnlich wie es bei der Pathogenese des rheumatischen Fiebers beschrieben wurde.^{16,17} Ein genetischer Einfluss wurde unter anderem durch Zwillingsstudien mehrfach nachgewiesen.^{18,19} Die RA ist demnach mit bestimmten MHC- bzw. HLA-Allelen assoziiert.^{18,19}

1.3 Pathogenese

Die RA ist nicht nur eine der häufigsten, sondern auch eine der folgeschwersten Gelenkerkrankungen. Eines ihrer zentralen Charakteristika ist die progressive, in vielen Fällen zur Invalidität führende Gelenkdestruktion. Diese unterscheidet die RA nicht nur von anderen Arthritiden, sondern bestimmt auch ihren Krankheitsverlauf.²⁰ Die Gelenkzerstörung resultiert aus der Invasion der entzündeten Gelenkinnenhaut in den artikulären Knorpel bzw. Knochen und ist das Resultat der in enger Wechselwirkung stehenden pathogenetischen Grundphänomene synoviale Hyperplasie, chronische Entzündung und pathologische Immunantwort.^{21,22}

Während die Ätiopathogenese nur teilweise verstanden ist, ist die Beteiligung von Immunzellen und deren proinflammatorischen Signalmolekülen das Charakteristikum, das der RA mit allen anderen systemischen Autoimmunerkrankungen gemeinsam ist.^{12,23-25}

Darüber hinaus weist die Synovia eines an RA Erkrankten eine spezielle Zellpopulation auf, die aktivierten synovialen Fibroblasten. Diese sind beteiligt an der Entstehung und Aufrechterhaltung der RA und differenzieren damit die RA von anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen.²⁶

1.3.1 Die Rolle der synovialen Fibroblasten (SFs)

Die progressive Destruktion artikulärer Strukturen durch die entzündlich veränderte Gelenkinnenhaut ist ein wichtiges Charakteristikum der RA und bestimmt die Krankheitsfolgen bei der Mehrzahl der betroffenen Patienten.²⁷ Obwohl die Ätiologie der Erkrankung weiterhin unbekannt ist, hat die Forschung der vergangenen Jahre große Fortschritte in Bezug auf die Aufklärung wichtiger pathogenetischer Mechanismen gemacht. So konnte gezeigt werden, dass neben Entzündungs- und Immunzellen auch das lokale Mesenchym der Gelenke entscheidend an der Pathogenese der RA beteiligt ist. Dabei sind v.a. SFs in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Neuere Erkenntnisse machen deutlich, dass SFs nicht nur passive, strukturgebende Zellen sind, sondern aktiv an der Immunantwort beteiligt sind und den Wandel von einer akuten zu einer chronischen Entzündung beeinflussen.²⁸

Fibroblasten sind als wichtigste ortständige Zellen der Gelenkinnenhaut entscheidend an der Homöostase ihrer Struktur beteiligt. Untersuchungen des vergangenen Jahrzehnts haben wesentlich zu der Erkenntnis beigetragen, dass Fibroblasten in der

Pathogenese der RA eine zentrale Rolle spielen, indem sie zu einer Schaltzentrale der synovialen Gewebereaktion werden.²⁹ Gleichzeitig unterliegen sie spezifischen Aktivierungsprozessen, die zu einem aggressiv-invasiven Verhalten führen.³⁰ Dabei ist die Reaktion dieser Fibroblasten nicht nur eine temporäre Antwort auf externe Stimuli, sondern vielmehr kommt es im Kontext des entzündeten Synoviums zu stabilen Veränderungen in den Fibroblasten, die einen aggressiv-invasiven Phänotyp begründen, den der aktivierten synovialen Fibroblasten.

Die Hypothese, dass aktivierte SFs eine zentrale Rolle in der rheumatischen Gelenkzerstörung spielen, geht auf Beobachtungen aus den frühen 80er Jahren zurück.³¹ Fassbender konnte zeigen, dass Fibroblasten der synovialen Deckzellschicht charakteristische morphologische und biologische Veränderungen aufweisen. Einen wichtigen funktionellen Beleg für einen spezifischen Phänotyp synovialer Fibroblasten bei RA erbrachten Untersuchungen von Müller-Ladner et al., die im severe combined immunodeficiency-Maus-Modell (SCID-Maus-Modell) durchgeführt wurden. Diese zeigten, dass SFs von RA Patienten, nicht aber von gesunden Kontrollen oder Patienten mit degenerativen Gelenkerkrankungen ihre krankheitsspezifischen Eigenschaften beibehalten, wenn sie aus dem pathologisch veränderten Gewebe herausgelöst werden.³²

RASFs, die in diesem Modell mit gesundem Knorpel koimplantiert wurden, wuchsen tief in den Knorpel ein und zerstörten diesen in ähnlicher Weise, wie dies im humanen Gelenk von Patienten mit RA zu beobachten ist.

Nach und nach wurde so die ursprüngliche Vorstellung, dass Fibroblasten mehr oder weniger passiv reagierende Zellen sind, welche auf Stimulation durch Umweltfaktoren mit einer veränderten Produktion und Resorption der extrazellulären Matrix reagieren, weitgehend durch ein Konzept ersetzt, das diese Zellen als Schlüsselkomponente der Gewebereaktion bei der RA betrachtet.³³

Zu den Hauptmerkmalen synovialer Fibroblasten von Patienten mit RA zählen neben der pathologischen Anheftung an den Gelenkknorpel, die gesteigerte Sekretion matrixzerstörender Enzyme sowie die Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber dem programmierten Zelltod.^{21,30,33} Dazu gehört insbesondere die Unfähigkeit dieser Zellen, die Apoptose zu vollenden bzw. auf Stimuli, die sie auslösen, adäquat zu reagieren.^{34,35} Histologische Untersuchungen zeigen, dass weniger als 3% der aktivierten SFs den programmierten Zelltod sterben.³⁶ Die Ursachen für die Veränderungen in der Suszeptibilität von RA Fibroblasten gegenüber dem

programmierten Zelltod sind nicht vollständig bekannt, allerdings scheinen eine Reihe von Mechanismen involviert. Beispielsweise ist der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) über eine Hemmung der rezeptorvermittelten Apoptose beteiligt und erhöhte Spiegel von small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) führen ebenfalls zu einer sinkenden Empfindlichkeit gegenüber der Apoptose.^{37,38} Zudem konnte gezeigt werden, dass B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), ein mitochondrienassoziiertes anti-apoptotisches Molekül, in RA Fibroblasten vermehrt exprimiert wird und zu den Veränderungen im programmierten Zelltod beiträgt.^{39,40}

Die Zerstörung der extrazellulären Matrix des Knorpels und Knochens erfolgt durch matrixzerstörende Enzyme, vor allem durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Kathepsine.³⁰ MMPs werden dabei als inaktive Proenzyme sezerniert und dann proteolytisch durch verschiedene Proteasen aktiviert.^{21,41}

Eine Reihe von Arbeiten hat die Beteiligung verschiedener MMPs bei der rheumatischen Gelenkzerstörung nachgewiesen und dabei gezeigt, dass synoviale Fibroblasten hier eine zentrale Rolle spielen. Mittels In-situ-Hybridisierung konnte dargelegt werden, dass die Quelle der MMPs in diesem Geschehen Zellen der Intimaschicht, im speziellen die Fibroblasten, sind. Die Fähigkeit der Fibroblasten Knorpel zu zerstören ist dabei ein mehrstufiger Prozess, der die Anheftung an den Knorpel und die Synthese von matrixdegradierenden Enzymen umfasst.^{15,17}

1.3.2 Grundsätzliches zur Funktion der Integrine

Die Anheftung an den Gelenkknorpel als initialem Schritt der Gelenkzerstörung wird in diesem Zusammenhang über auf den SFs exprimierte Integrine vermittelt, die am Kontakt synovialer Fibroblasten mit der Extrazellulärmatrix des Knorpels maßgeblich beteiligt sind. Bei den Integrinen handelt es sich um transmembrane, heterodimere Proteine, die aus je einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Die α -Untereinheit bestimmt dabei die Ligandenspezifität, während die β -Untereinheit intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt.⁴² Mehr als 16 α - und 8 β -Untereinheiten werden zu mindestens 24 Integrinen kombiniert.^{43,44} Weitere Adhäsionsmoleküle wie das Vascular Cellular Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) und die Fibronectin-Spleißvariante CS-1 werden ebenfalls von RASFs synthetisiert.⁴⁵

Integrine sind aber mehr als nur Mechanozeptoren, die eine Verbindung zwischen Zelle und Umgebung herstellen. Vielmehr fungieren Integrine auch als Rezeptoren bzw.

Signalmoleküle, die zur Stimulierung der RASFs beitragen.⁴⁶ So bewirken sie beispielsweise eine Aktivierung Rat sarcoma (Ras)-abhängiger Signalwege, die dann über verschiedene mitogen-activated protein (MAP)-Kinasen wie extracellular-signal regulated kinase (ERK) und c-Jun N-terminale kinase (JNK) weitergeleitet werden können.^{21,33,44}

Insgesamt spielen Integrine eine zentrale Rolle, indem sie sowohl Zelladhäsion und -migration als auch Wachstum, Differenzierung und Apoptose kontrollieren. Auf diese Weise leisten sie einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung der Zelle, der Immunität des Organismus, dem Ablauf von Entzündungsreaktionen und der Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichts. Daraus ergibt sich der Einfluss dieser Moleküle auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen oder auch Neoplasien.⁴³

1.3.3 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Osteoarthritis (OA) und rheumatoider Arthritis

Um die bei den SFs der OA und RA Patienten zu beobachtenden Ergebnisse besser zu verstehen, ist es von Nöten, sich über die Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der beiden zugrundeliegenden Krankheiten klar zu werden.

Obwohl man die eine prinzipiell als „mechanische“ und die andere als „entzündliche“ Erkrankung ansieht, muss man feststellen, dass es innerhalb dieser beiden Pathologien gemeinsame entzündliche Mechanismen gibt, die sich vor allem in ihrer Intensität unterscheiden. Besonders die erhöhte Rate an IL-1 und TNF- α stimuliert die Synthese von MMPs, Kollagenasen oder Kathepsin B. Diese proteolytischen Enzyme sind zusammen mit freien Radikalen (Stickoxiden) verantwortlich für die Zerstörung des Gelenkknorpels.

Allerdings scheint bei der RA die Entzündung von Gelenk und Synovium die Hauptursache der Erkrankung zu sein, während die OA die Reaktion auf sich ablösende Knorpel-Knochen-Bestandteile, welche das entzündliche Geschehen auslösen und unterhalten, darstellt.⁴⁷

In einigen Studien konnten entzündliche Veränderungen innerhalb der Synovialmembran von an OA erkrankten Patienten nachgewiesen werden, die kaum von den Veränderungen im Rahmen von entzündlichen Arthritiden wie der RA unterschieden werden können.⁴⁸ Trotz der auftretenden Gelenkentzündung wird die OA

jedoch für gewöhnlich als eine nicht-entzündliche Erkrankung klassifiziert, da die Leukozytenmenge im Gelenkpunktat typischerweise unter der Grenze liegt, ab der von einem inflammatorischen Prozess gesprochen wird (2000 Zellen pro mm³).⁴⁹

Entsprechende klinische Symptome, der histologische Nachweis einer synovialen Entzündung sowie frühe Knorpelläsionen an der Grenze zum entzündeten Synovium machen deutlich, dass die traditionelle Sichtweise zur OA als einer nur auf den Knorpel begrenzten Erkrankung inzwischen obsolet erscheint. Während bei der RA erosive Prozesse im Vordergrund stehen, ist die Pathologie der OA durch Knorpeldegeneration, subchondrale Sklerosierung und die Bildung von Osteophyten gekennzeichnet.⁵⁰

Behandlungsansätze, die auf ehemals vernachlässigte Komponenten der OA abzielen, könnten sowohl einer Verbesserung der Symptome als auch der Verhinderung struktureller Schäden zugutekommen.⁵¹

Langfristig ist es deshalb wichtig, dass im Rahmen der Pathogeneseforschung zentrale Stoffwechselwege und zelluläre Aktivierungsmechanismen aufgeklärt werden. Die Hemmung und Beeinflussung dieser Signalwege könnten als neue therapeutische Ansätze fungieren, um die fortschreitende Zerstörung des Gelenks aufzuhalten.

Wie sich anhand von Verbesserungen der RA-Symptomatik während der Schwangerschaft zeigt, nehmen Hormone bei der Beeinflussung dieser Signalwege eine zentrale Stellung ein.

1.4 Der Einfluss von Sexualhormonen auf die RA

1.4.1 Hintergrund

Frühe Studien zum physiologischen Effekt von Sexualhormonen gehen bis ins zweite Jahrhundert v. Chr. zurück. In China wurden Östrogene und Androgene aus menschlichem Urin mittels Sublimation extrahiert, gereinigt und zur Behandlung verschiedenster Leiden, einschließlich Hypogonadismus und Dysmenorrhoe, eingesetzt.⁵²

Während der letzten 50 Jahre erfolgte die Berücksichtigung von Östrogenen und Androgenen bezüglich der Pathophysiologie und Therapie von rheumatischen Erkrankungen auf Basis neuer Erkenntnisse zur Interaktion dieser Hormone mit den molekularen Mechanismen, die den entzündlichen Immunprozessen zu Grunde liegen.⁵²

Dabei scheinen Androgene und Progesteron als natürliche Immunsuppressoren zu fungieren, während Östrogene in physiologischer Konzentration als Verstärker der

Immunantwort, wenigstens der humoralen, gelten.⁵³⁻⁵⁸

Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass Frauen insgesamt öfter von rheumatischen Erkrankungen betroffen sind als Männer.^{59,60} Die Inzidenz liegt bei etwa 4:1.⁶¹ Für die Unterschiede im Outcome zwischen Frauen und Männern ist dabei hauptsächlich die Menopause mit ihren niedrigen Steroidhormonspiegeln verantwortlich.⁶² Das unterstützt die Annahme, dass Androgene Männer vor der Entwicklung entzündlicher Immunerkrankungen bewahren.⁶³ So konnte auch gezeigt werden, dass ein männliches Geschlecht als wichtiger Prädiktionsfaktor für die Remission einer frühen RA zu sehen ist.⁶⁴ Verschiedenste physiologische, pathologische und therapeutische Veränderungen, wie zum Beispiel Menstruationszyklus, Schwangerschaft, Postpartum, Menopause, chronischer Stress, der Gebrauch von Kortikosteroiden, oralen Kontrazeptiva und der Einsatz einer Hormonersatztherapie, beeinflussen das hormonale Gleichgewicht und damit auch das Verhältnis von Androgenen zu Östrogenen.^{58,65-70}

Ein verändertes Gleichgewicht an Sexualhormonen in der Synovialflüssigkeit von RA Patienten mit einer geringeren Konzentration immunsuppressiver Androgene und mehr immunverstärkend wirkenden Östrogenen könnte sich somit verstärkend auf die Entwicklung einer immunvermittelten rheumatoiden Synovitis auswirken.⁷¹

So wurden geringe gonadale und adrenale Androgenkonzentrationen wie auch eine reduzierte Androgen/Östrogen Ratio im Serum und anderen Körperflüssigkeiten von männlichen und weiblichen RA Patienten gefunden, was die Vermutung stützt, dass niedrige Androgenspiegel bei der Pathogenese der RA eine Rolle spielen.^{58,68,72}

Tatsächlich verweist eine große Anzahl an Studien und Übersichtsarbeiten der letzten 20 Jahre auf eine reduzierte Konzentration von Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Testosteron und Progesteron bei weiblichen und männlichen RA Patienten.⁷³

Es konnte gezeigt werden, dass Serumtestosteronspiegel invers mit der Krankheitsaktivität korrelieren und eine geringe Menge an DHEAS im Serum sowohl mit einer längeren Krankheitsdauer als auch einem ausgeprägteren klinischen Schweregrad einhergeht.^{74,75}

In der Tat weisen männliche RA Patienten im Vergleich zu gesunden Männern geringere Testosteronspiegel und höhere Estradiolwerte in der Synovialflüssigkeit und im Serum auf.^{61,72} Die Menge an Estradiol korrelierte dabei stark mit der Ausprägung der Entzündung (Serumspiegel von $9,3 \times 10^{-11}$ M vs. $7,4 \times 10^{-11}$ M bei Gesunden).⁶¹

All diese Daten lassen auf eine forcierte periphere Konversion von Androgenvorstufen

zu Östrogenen bei männlichen und weiblichen RA Patienten schließen.^{76,77}

Beteiligt an der Umwandlung ist dabei der Aromatase-Enzymkomplex. Eine Erklärung für die hohen Östrogenkonzentrationen vor allem in der Synovialflüssigkeit beider Geschlechter ergibt sich aus dem Umstand, dass inflammatorische Zytokine, z. B. TNF- α , Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 (IL-1), die bei RA Synovitis vermehrt vorhanden sind, die Aromataseaktivität in der Peripherie stimulieren.⁷⁸⁻⁸⁰ Daraus resultiert das veränderte hormonale Gleichgewicht mit niedrigeren Androgen- und höheren Östrogenkonzentrationen.^{71,81} Es konnte gar ein relativer Überhang von Östrogenen zu Androgenen im Verhältnis 6:1 gezeigt werden.⁶⁶

Die Wirkungsweise und intrakrinen Effekte lokaler Sexualhormone zu erfassen ist von enormer Bedeutung im Hinblick auf das Verständnis der Modulation immunvermittelter inflammatorischer Prozesse durch diese Hormone.

Offensichtlich spielen Sexualhormone eine wichtige Rolle im Hinblick auf Beginn und Fortdauer einer rheumatischen Erkrankung.⁸²

Bei der Beobachtung der immunregulierenden Rolle von Östrogenen ist ein Paradoxon auszumachen: Auf der einen Seite kommt ihnen sowohl eine knochenprotektive Wirkung als auch ein immunsupprimierender Effekt bei chronisch entzündlichen Erkrankungen in einigen Tiermodellen zu. Auf der anderen Seite wirken sie immunsystemunterstützend bei traumatischen und septischen Geschehen und haben eine proinflammatorische Rolle bei einigen chronischen Autoimmunerkrankungen des Menschen.^{58,83}

Es scheint, dass variierende Östrogenkonzentrationen unterschiedliche, ja sogar gegensätzliche Effekte auf Immunzellen ausüben.^{83,84} In pharmakologisch hoher Konzentration inhibiert 17 β -Estradiol die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α , während es in physiologisch wirksamer Konzentration die Immunglobulinproduktion ankurbelt.⁸⁵

Dieser dichotome Effekt von Estradiol auf Interleukin-1 β (IL-1 β) und TNF ist höchstwahrscheinlich der Inhibition von „nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells“ (NF- κ B) bei hohen Konzentrationen zuzuschreiben.⁸³

Auch Testosteron scheint mit dem NF- κ B-Komplex zu interferieren, wobei aber hieraus eine reduzierte Makrophagenproliferation und ein proapoptotisches Milieu resultiert.⁸⁶ Estradiol dagegen reduziert dosisabhängig den programmierten Zelltod von Immunzellen, was als proinflammatorisches Charakteristikum aufgefasst werden

muss.^{58,83,87,88}

Viele in vitro Studien haben auch gezeigt, dass Östrogene in hohen Konzentrationen die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin oder VCAM-1 unterdrücken, während es bei niedrigen Konzentrationen umgekehrt zu sein scheint.⁸³

Japanischen Untersuchungen zufolge inhibiert Dihydrotestosteron (DHT) die TNF- α oder Interleukin-1 α (IL-1 α) vermittelte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, fungiert damit als negativer Regulator in der Pathogenese der RA und scheint unter anderem auf diese Weise zu den geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Entwicklung einer RA beizutragen.^{89,90}

Im Laufe einer aktiven RA kommt es sowohl bei weiblichen als auch männlichen Patienten durch die ständige Überaktivierung der Hypothalamus-Hypophysenachse durch proinflammatorische Stimuli und chronischen Stress zu einer Abnahme ihrer Aktivität.^{91,92} Dies resultiert in einem Abfall der Serumspiegel von antiinflammatorisch wirkendem Testosteron und DHEAS, was den entzündlichen Prozess weiter unterhält.

Eine kleine randomisiert-kontrolliert durchgeführte Studie zeigte eine signifikante Verbesserung der Symptome bei männlichen Patienten mit RA unter Testosteronbehandlung.⁹³

Progesteron bindet sowohl intrazelluläre als auch membrangebundene Rezeptoren mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 7 nM bzw. 90 nM.^{94,95} Zusätzlich kann es in hohen physiologischen und pharmakologisch wirksamen Konzentrationen (>200 nM) Glukokortikoidrezeptoren binden, die in den meisten Immunzellen in großer Anzahl zu finden sind.^{96,97} In Bezug auf die Wirkung von Progesteron im menschlichen Organismus ist zu erwähnen, dass es den T-Helfer-Zelle-1-Pathway (Th1-Pathway) inhibiert, den T-Helfer-Zelle-2-Pathway (Th2-Pathway) anregt, ebenso wie die CD30-Expression auf T-Zellen und die Ausschüttung von TNF, IL-1 β und IL-6 unterdrückt.^{85,98,99} Es wird angenommen, dass die Balance von Th1- und Th2-Zellen eine Rolle in der Pathogenese der RA spielt.^{100,101} So konnte in entzündeten Gelenken von RA Patienten ein Überwiegen der Th1-Zell-Aktivität gegenüber der von Th2-Zellen gezeigt werden.^{101,102} Dieses Ungleichgewicht von Th1- und Th2-Zellen wies zudem eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität auf.¹⁰⁰ Während einer Schwangerschaft beispielsweise findet eine Verschiebung hin zur Th2-Antwort statt, was einem Anstieg an zirkulierendem Progesteron zugesprochen werden kann.^{103,104} Progesteron auf Schwangerschaftsniveau mildert also die Krankheitsaktivität einer RA über die

Suppression von Th1- und Th17-Signalwegen sowie die Induktion von antiinflammatorischen Molekülen. Schon die Bezeichnung Progesteron, zusammengesetzt aus dem Präfix „pro“ und dem lateinischen Wort „gestare“ für „tragen, austragen, schwanger sein“, deutet auf die wichtige Rolle dieses Hormons im Rahmen einer Schwangerschaft hin.¹⁰⁵

Man nimmt an, dass viele der immunmodulatorischen Veränderungen im Zuge einer Schwangerschaft von Progesteron und Estradiol hervorgerufen werden. Während eine Reduktion von Estradiol auf ein postmenopausales Level zu einem proinflammatorischen Milieu beiträgt, inhibieren periovulatorische bis gestatorische Estradiolspiegel wichtige proinflammatorische Signalwege.¹⁰⁶ So berichten 75% der Patientinnen mit RA über eine schwangerschaftsinduzierte Remission, allerdings kommt es bei mehr als 60% nach der Geburt zu einem Wiederaufflammen der Erkrankung.¹⁰⁷ Die Beobachtung, dass sich eine Schwangerschaft günstig auf den Verlauf einer RA auswirkt, geht bis ins 19. Jahrhundert (Trousseau 1871, Charcot 1881, Bannatyne 1896) zurück. Dieser Umstand fand auch in der Nobelpreisrede des Rheumatologen Philip S Hench am 11. Dezember 1950 seine Berücksichtigung.¹⁰⁸

Während des Ablaufs einer normalen Schwangerschaft nehmen die Konzentrationen an Cortisol, DHEA, Progesteron, Östrogen und Norepinephrin stark zu.¹⁰⁹ So erhöht sich beispielsweise der Progesteronspiegel im Serum um den Faktor 4 und der von Östriol um den Faktor 20, was als pharmakologisch hohe Dosierung angesehen werden kann. Die Progesteronkonzentrationen im Gewebe können dabei 10 bis 100 Mal höher sein als die im mütterlichen Blut und damit hoch genug um Glukokortikoidrezeptoren zu aktivieren.

Von diesen Hormonen führen Cortisol, Östrogene, Norepinephrin und besonders Progesteron zu einer Vorherrschaft des Th2-Signalwegs. Zusätzlich inhibieren diese Hormone zusammen mit der Hormonvorstufe DHEA viele proinflammatorische Eigenschaften der Makrophagen.⁶⁹ Die bereits oben erwähnte Inhibition des NF-κB-Signalwegs durch Östrogene wurde ebenfalls erst bei hohen Konzentrationen beobachtet, die in etwa denen in der Spätschwangerschaft entsprechen.¹¹⁰

Patienten mit RA könnten also von der therapeutischen Gabe von Schwangerschaftsdosen an Östrogen profitieren, wie es auch bereits bei der Multiplen Sklerose gezeigt wurde.¹¹¹

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu eruieren, welchen Effekt der Einsatz von 17β-Estradiol, ICI182,780, DHT und Progesteron in verschiedenen Dosierungen auf die

Integrinexpression synovialer Fibroblasten hat, um eventuelle Rückschlüsse auf die pro- vs. antiinflammatorische Wirkung der unterschiedlichen Dosierungen und der Mehr- oder Minderexpression der Integrine zu ziehen.

1.4.2 ICI 182,780, herkömmliche Östrogenrezeptoren und GPR30 (G-protein coupled receptor 30)

Bei ICI 182,780 handelt es sich um einen selektiven Östrogenrezeptormodulator (SERM), einen Stoff, der in bestimmten Geweben als Östrogenagonist agiert und in anderen als Antagonist.¹¹²

In den 60er und 70er Jahren des 20. Jahrhunderts gelang es einen nukleären Östrogenhormonrezeptor (später ER α genannt) zu charakterisieren.¹¹³ Als zweiter Östrogenrezeptor wurde 1996 ER β entdeckt.¹¹⁴ ER β ist in hohem Maße homolog zu ER α und die beiden Rezeptoren sind entwicklungsgeschichtlich miteinander verknüpft. Herkömmliche Steroidrezeptoren wie ER α und ER β bestehen aus einer Bindungsdomäne für den Liganden, einer für DNA (Desoxyribonukleinsäure) und zwei transkriptionsaktivierenden funktionalen Domänen. Die Bindung von Östrogen an ER führt zur Freisetzung des Rezeptors aus einem Inhibitionskomplex mit Hitzeschockproteinen, was dem monomeren Rezeptor ermöglicht zu dimerisieren, zum Nukleus zu gelangen und als ligandaktivierter nukleärer Transkriptionsfaktor Hormone-Response-Elemente (HRE) in den Promotorregionen hormonal regulierter Gene zu binden.^{112,115} Bis vor wenigen Jahren wurde der Einfluss von Östrogenen auf das Genom und schnelle Signaltransduktionsprozesse allein diesen klassischen Östrogenrezeptoren zugeschrieben. Die Erkenntnis, dass es Östrogenen gelingt G-Protein vermittelte Signalwege zu aktivieren und die Lokalisierung von östrogenbindenden Stellen an der Membran legte allerdings die Vermutung nahe, dass auch ein Mitglied der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an bestimmten Aspekten der Östrogenfunktion beteiligt ist (vgl. Abb. 1.2).^{116,117} So zeigten zwei Studien aus dem Jahr 2005, dass Östrogen Signale mit Hilfe eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, auch bekannt unter dem Namen GPR30, vermitteln kann.^{118,119} GPR30 ist ein 7-Transmembran-Rezeptor (7TMR), der selektiv das physiologisch aktive 17 β -Isomer von Estradiol bindet.¹²⁰ GPR30 triggert die Freisetzung von membrangebundenem HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor), das an EGFR (epidermal growth factor receptor) bindet und zu dessen Aktivierung führt.¹²¹ Klassische Östrogenrezeptorantagonisten wie Tamoxifen und

Fulvestrant (ICI 182,780) sind GPR30-Agonisten.¹²²

GPR30 kann somit als signaltransduzierender Rezeptor bei der Östrogenrezeptorblockade fungieren.

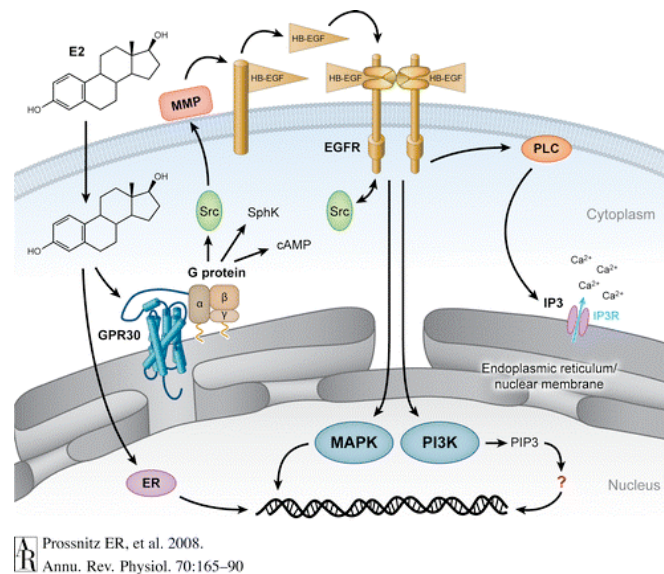


Abb. 1.2: Östrogenvermittelte Aktivierung von ER und GPR30

Die physiologischen Effekte von Östrogenen werden durch klassische nukleäre Östrogenrezeptoren (ER) und durch GPR30 vermittelt. Dabei können beide sowohl die Transkription als auch schnelle Signaltransduktionsprozesse beeinflussen. Letzteres erfolgt über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP), was in der Freisetzung von heparin-bindendem EGF (HB-EGF) und der folgenden Transaktivierung von epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR) resultiert. Im weiteren Verlauf kommt es auch zu einer Beteiligung von mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die ihrerseits nukleäre Transkription und Zellproliferation beeinflussen können.

Quelle: Prossnitz, E.R., et al. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. Annu Rev Physiol 70, 165-190 (2008).

1.5 IL-6 als Schlüsselzytokin in der Entstehung der RA

Erhöhte Spiegel an IL-6 werden bei einigen chronisch entzündlichen Erkrankungen des Menschen beobachtet. Dazu zählen neben der RA auch der Morbus Castleman oder die systemische juvenile idiopathische Arthritis. Auch bei mehreren experimentell induzierten Autoimmunerkrankungen kommt IL-6 eine zentrale Rolle zu.¹²³ In der Tat handelt es sich bei IL-6 um das sowohl im Serum als auch in der Synovialflüssigkeit bei RA am höchsten konzentrierte Zytokin. Dabei zeigt sich zum einen eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität und zum anderen ein Zusammenhang mit der Gelenkzerstörung.^{124,125} Es wird also vermutet, dass IL-6 eine Reihe von lokalen und systemischen Wirkungen bei dieser Erkrankung besitzt (vgl. Abb. 1.3).

1.5.1 Biologie und Rezeptoraktivierung

IL-6, dessen Gen auf Chromosom 7 lokalisiert werden kann, ist ein Glykopeptid mit einer Größe von 26 kDa. Entdeckt wurde es 1986 als B-Zell-Differenzierungsfaktor, welcher die Umwandlung von aktivierten B-Zellen in Immunglobulin produzierende Plasmazellen anregt.¹²⁶ Im Laufe der Zeit wurde schließlich die Pleiotropie von IL-6, welches durch verschiedene Immun- und mit dem Immunsystem assoziierte Zellen, wie z. B. Monozyten, Fibroblasten, Lymphozyten und Endothelzellen, gebildet wird, erkannt. IL-6 ist ein hormonell reguliertes Zytokin. Seine Produktion wird durch Katecholamine stimuliert sowie von Glukokortikoiden und Östrogenen unterdrückt.¹²⁷⁻¹²⁹ So findet sich beispielsweise auch eine Inhibition der Interleukin-6 Produktion unter Hormonersatztherapie.¹³⁰

Über die Bindung von IL-6 an den IL-6 Rezeptor (IL-6R) und das membrangebundene Protein gp130 entsteht der IL-6/IL-6R-Komplex, welcher die Signaltransduktion initiiert. Hierdurch wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche die Aktivierung der Janus-Kinasen (JAKs), der „signal transducers and activators of transcription“ STAT₁ und STAT₃, der Tyrosinphosphatase SHP₂ und von NF-kB beinhaltet.¹³¹ Während gp130 ubiquitär exprimiert wird, findet sich der IL-6R hauptsächlich auf Hepatozyten, Neutrophilen, Monozyten/Makrophagen und einigen Lymphozyten.¹³² Auch der lösliche IL-6R (sIL-6R) bindet IL-6 und kann einen Signalkomplex mit gp130 auf Zellen bilden, die keinen transmembranen IL-6R besitzen. Dieser Vorgang wird als „Trans-Signaling“ bezeichnet.¹³³ Über diese beiden Formen der Rezeptoraktivierung ist IL-6 in verschiedenste physiologische und pathologische Prozesse involviert. Dazu zählen beispielsweise Abläufe im Bereich der Immunantwort, Hämatopoese, Akut-Phase-Reaktionen und Vorgänge im Knochenstoffwechsel.¹³⁴

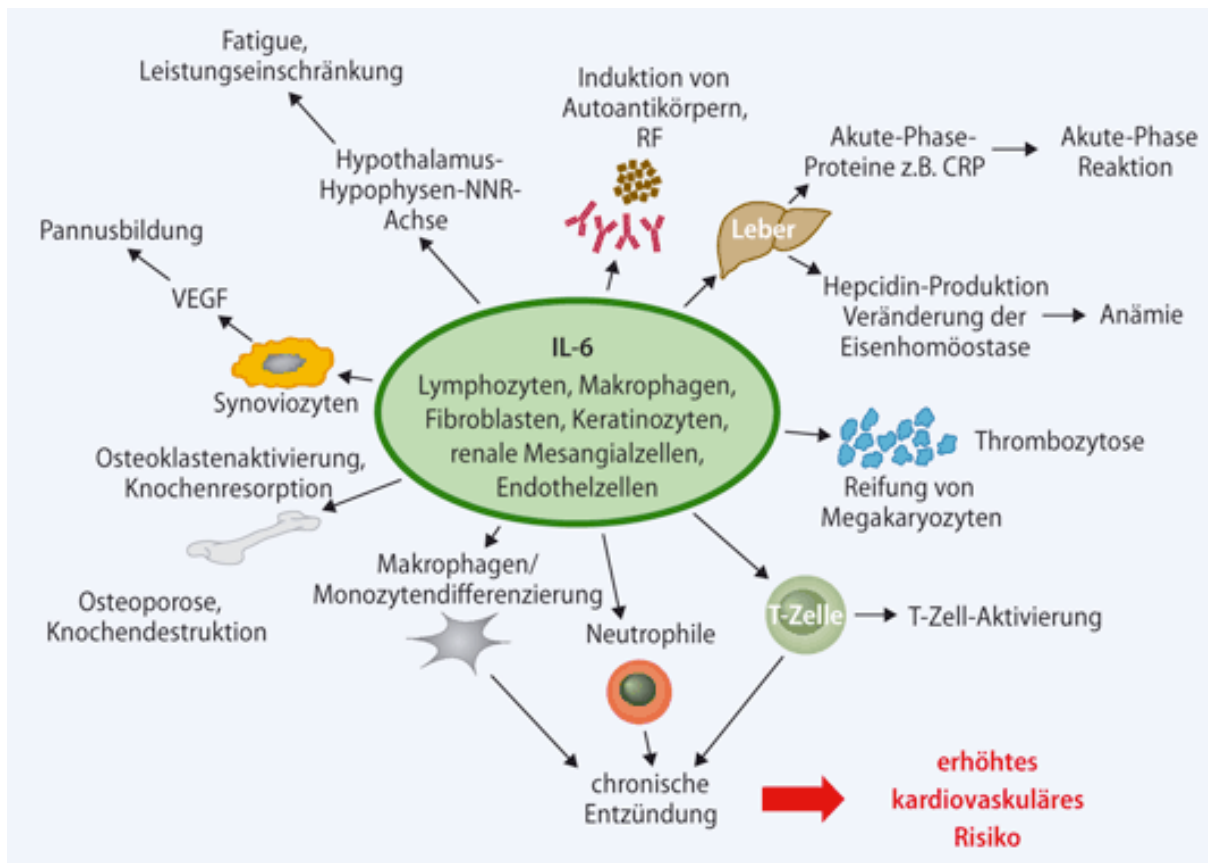


Abb. 1.3: Zusammenschau der lokalen und systemischen Effekte des pleiotropen Zytokins IL-6

Quelle: Roll, P., Rubbert-Roth, A. & Tony, H.P. [Tocilizumab. What comes after TNF-blockers in clinical routine?]. *Z Rheumatol* 69, 608-617 (2010).

1.5.2 Die Wirkung von IL-6 auf Gelenkebene

Auf Gelenkebene ist IL-6 über unterschiedliche Mechanismen an der Pathogenese der RA beteiligt. Zum einen kommt ihm eine zentrale Rolle in der Modulation des Inflamationsprozesses von der akuten hin zur chronischen Entzündung zu.¹³⁵ Als zweites stimuliert IL-6 die Osteoklastenbildung und führt zur Knochendestruktion- und resorption.^{136,137} Über eine zusätzliche Verminderung der Osteoblasten wird zudem die Ausbildung einer Osteoporose begünstigt.¹³² Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-6 die Bildung von „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) im Synovium stimuliert und hierdurch zur Pannusbildung beiträgt.^{138,139}

1.5.3 Die Rolle von IL-6 bei der erworbenen Immunantwort

Neben der Förderung der Gelenkzerstörung hat IL-6 auch Einfluss auf die B-Zelldifferenzierung und die Produktion von Autoantikörpern, wurde es doch auch ursprünglich als B-Zell-Differenzierungsfaktor identifiziert.¹⁴⁰ Das Krankheitsbild der RA ist charakterisiert durch einen Anstieg an Rheumafaktor und Antikörpern gegen cyclisches citrulliniertes Peptid (CCP). Eine Depletion der B-Zellen ist bei einigen Patienten mit RA von therapeutischem Nutzen und zeigt die Bedeutung der B-Zell-Aktivität auf die Entzündung der Synovia und die Gelenkzerstörung bei dieser Erkrankung. Aber nicht nur durch eine Modulation der B-Zellen trägt IL-6 zur Induktion und Aufrechterhaltung des Autoimmunprozesses bei. IL-6 beeinflusst zusätzlich in Kombination mit IL-1 β und IL-23 die T-Zell-Entwicklung in Richtung Th17-Zellen, welche in Tiermodellen mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen assoziiert sind.¹³¹

1.5.4 Der Einfluss von IL-6 auf die Entwicklung systemischer Symptome der RA

Zur entzündungsfördernden Wirkung auf lokaler Ebene kommt IL-6 auch Bedeutung im Hinblick auf die Entwicklung systemischer Symptome zu. Als proinflammatorischer Mediator verursacht es allgemeine Entzündungszeichen wie Fieber und Fatigue und stimuliert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen wie CRP, Fibrinogen, α_1 -Antitrypsin und Serumamyloid A in Hepatozyten.¹⁴¹ Eine Folge der chronischen Entzündung stellt die Entwicklung einer Arteriosklerose und der damit verbundenen kardiovaskulären Erkrankungen dar. So zeigten sich neben erhöhten CRP-Werten auch erhöhte Serumspiegel von IL-6 mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Letalität assoziiert.¹³¹ Es wird vermutet, dass die Überexpression von IL-6 auch für die bei RA Patienten beobachtete Thrombozytose verantwortlich ist.¹⁴² Zudem lässt sich die Anämie bei RA Patienten durch hohe IL-6-Spiegel erklären. In der Leber wird durch IL-6 die Sekretion des Hormons Hepcidin stimuliert.¹⁴³ Hepcidin ist ein zentraler Regulator des Eisenmetabolismus, indem es die interstitielle Eisenabsorption hemmt und die Eisenfreisetzung aus Makrophagen beeinträchtigt.¹⁴⁴ Durch Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse mit Erhöhung von adrenokortikotropem Hormon (ACTH), Cortisol, Wachstumsfaktoren und Prolaktin hat IL-6 auch Einfluss auf endokrine Regulationsmechanismen. Klinisch kann sich dies in vermehrter Müdigkeit, mangelnder Konzentrationsfähigkeit und deutlicher

Leistungseinschränkung widerspiegeln.^{132,145}

1.5.5 Die Blockierung des IL-6 Rezeptors in der Behandlung der RA

Aufgrund der maßgeblichen Rolle, die IL-6 bei der Immunantwort und im gesamten Entzündungsprozess innehat, stellt die Blockade des IL-6 Signalweges eine wichtige Behandlungsmöglichkeit bei mäßiger bis schwerer RA dar.¹²³ Dafür wurde Tocilizumab im Januar 2009 als erster monoklonaler Antikörper von der Europäischen Kommission zugelassen. Der Erfolg, der damit bislang in der Therapie erzielt wurde, bestätigt ebenfalls die zentrale Stellung von IL-6 bei der Entwicklung der RA.^{146,147}

1.6 Ziel der Arbeit

Die Charakterisierung der pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der RA ist in den letzten Jahren erheblich genauer geworden, wobei das Synovium mit seinen zellulären Bestandteilen, den SFs, als Ort der Entzündung zunehmend im Vordergrund des Interesses steht. Ein besseres Verständnis der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen ist dabei von Bedeutung, da diese Prozesse für die Veränderungen im Bereich der Gelenkstrukturen enorm wichtig sind. Mittels in vitro Untersuchungen wurde der Versuch unternommen, diese Aktivierungsvorgänge nachzuvollziehen und dabei den Einfluss von Sexualhormonen auf das Entzündungsgeschehen zu untersuchen. Die folgenden Ausführungen zeigen die entsprechenden Veränderungen im Expressionsmuster verschiedener Oberflächenintegrine, die zum einen die Anheftung an die extrazelluläre Matrix vermitteln und zum anderen eine zentrale Rolle bei Migration, Wachstum, Differenzierung und Apoptose spielen.⁴³ Hormonelle Manipulation der Spiegel des Schlüsselzytokins IL-6 und der Integrinexpression soll das komplexe System von Aktivierung und Deaktivierung, Entzündungsförderung und -hemmung erklären, um daraus in der Zukunft therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

Die in den nächsten Abschnitten detailliert aufgeführten Ergebnisse beschreiben nicht nur Veränderungen im Rahmen der RA, sondern beziehen sich auch auf vergleichende Untersuchungen bei den sogenannten degenerativen Gelenkerkrankungen. Gerade der Vergleich dieser beiden Erkrankungen ist im Hinblick auf die Annahme interessant, dass auch bei der OA biologisch aktive Vorgänge eine Rolle spielen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Patienten

Die Studiengruppe umfasst 20 Patienten mit langjährig bestehender RA gemäß den Kriterien des American College of Rheumatology¹⁴⁸ und 20 Patienten mit OA. Diese Patienten haben sich einem elektiven Eingriff zum Kniegelenksersatz unterzogen, wurden informiert über den Zweck dieser Studie und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Universität Regensburg genehmigt. Klinik- und Laborparameter wurden unmittelbar vor der Operation aufgezeichnet (siehe Tab. 2.1). Daten wie die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und die Höhe des C-reaktiven Proteins wurden mit Standardverfahren bestimmt.

Charakteristika	Osteoarthritis (n=20)	Rheumatoide Arthritis (n=20)
Männer/Frauen	9/11	4/16
Alter, $\bar{x} \pm SD$ in Jahren	67,0 \pm 2,2	65,0 \pm 2,4
C-reaktives Protein, $\bar{x} \pm SD$ in mg/dl	1,4 \pm 0,4	5,1 \pm 2,5
BSG, $\bar{x} \pm SD$ in mm/h	13 \pm 1,7	28,4 \pm 7,3
Therapie		
NSARs	15	16
Prednisolon	NA	15
Dosis Prednisolon, $\bar{x} \pm SD$ in mg/d	NA	8,5 \pm 1,4
Methotrexat	NA	11
Sulfasalazin	NA	1

Tab. 2.1: Charakteristika der Studienteilnehmer (Osteoarthritis vs. rheumatoide Arthritis)

Dargestellt sind Geschlecht, mittleres Alter der Studienteilnehmer, Entzündungswerte und Medikation. Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die Werte der Anzahl an Patienten. SD = Standardabweichung, BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit, NSARs = nicht-steroidale Antirheumatika, NA = nicht anwendbar.

2.2 Präparation des Synovialgewebes und der Fibroblasten

Synovialgewebeproben von Patienten mit OA und Patienten mit RA wurden direkt nach Eröffnung der Kniegelenkshöhle gewonnen. Die Gewebeproben wurden gesäubert und in Medium (RPMI-1640, 25mM HEPES, 5% fetales Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin, 30 μ M Mercaptoethanol, 0,57 mM Ascorbinsäure, 1,3 mM Calcium, alle Zusätze von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gegeben. Dabei wurden Stücke von bis zu 9 cm² Größe aus der weißen, glänzenden Oberfläche des Synovialgewebes der Kniegelenkshöhle herausgeschnitten. Fettgewebe und Gewebe mit einer großen Anzahl an Blutgefäßen wurde sorgfältig entfernt. Ein Teil der Gewebeproben wurde geschnitten und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C in Gefriermedium (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) aufbewahrt. Der andere Teil wurde zerstückelt und in Dispase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gegeben. Anschließend wurde das Ganze für mindestens 1 h bei 37°C auf einen Rüttler gestellt und aufgelöst. Die so erhaltene Suspension wurde gefiltert (Porengröße 70 μ m) und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann für 5 min einem Erythrozytenlysepuffer (20,7 mg NH₄Cl, 1,97 mg NH₄HCO₃, 0,09 mg EDTA und 1 l H₂O) ausgesetzt und anschließend für 10 min bei 300 g rezentrifugiert. Sodann wurde das daraus erhaltene Zellpellet in RPMI-1640 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), versetzt mit 10% FCS, resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und jeweils 100.000 Zellen auf 75 cm² umfassende Zellkulturflaschen verteilt. Nachdem sie über Nacht inkubiert worden waren, wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Medien und Lösungen

- PBS:
 - 7,3 mM Na_2HPO_4
 - 1,47 mM KH_2PO_4
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl; pH 7,2
 - steriles PBS: Dulbecco's PBS 1× (PAA, Pasching, Österreich)
 - Kulturmedium:
 - RPMI-1640 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
 - 1% HEPES-Puffer (PAA, Pasching, Österreich)
 - 10% FCS (PAA, Pasching, Österreich)
 - 5 ml Penicillin/Streptomycin (0,01% Endkonzentration; PAA, Pasching, Österreich)
 - 500 µl Amphotericin B (0,25 mg/ml Ausgangskonzentration; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
 - 10 ml einer 200 mM L-Glutamin-Lösung (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Zum Aushungern wurde das Kulturmedium ohne Zugabe von FCS verwendet. Bei geplanter Stimulation mit 17β -Estradiol wurde zum Oxidationsschutz L (+)-Ascorbinsäure 50 µg/ml ($M=176,13$ g/mol; Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt.
- Gefriermedium:
 - 10% DMSO (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 40% FCS, 50% serumfreies Medium
 - Trypsin/EDTA-Lösung: 5 ml konzentriertes Trypsin/EDTA (0,5%/0,2% in PBS; PAA, Pasching, Österreich) auf 45 ml PBS

2.3.2 Zellkultivierung

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Als Kulturgefäße kamen sterile Corning-Kulturflaschen (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² bzw. 75 cm² zum Einsatz. Dem Medium RPMI-1640 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden 10% FCS (PAA, Pasching, Österreich), 10 ml einer 200 mM Stammlösung L-Glutamin (Invitrogen, Carlsbad, USA), 5 ml einer Penicillin-/Streptomycinlösung mit Endkonzentration 0,01% (PAA, Pasching, Österreich) und 500 µl Amphotericin B (0,25 mg/ml Ausgangskonzentration, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) sowie 5 ml eines 1M HEPES-Puffers (PAA, Pasching, Österreich) zugefügt. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag unter sterilen Bedingungen gewechselt. Es wurde bei 4°C gelagert und kurz vor Verwendung auf 37°C erwärmt. Die Konfluenz der adhären wachsenden Zellen wurde durch ein Phasenkontrastmikroskop optisch kontrolliert. Das Passagieren der Zellen erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit etwa alle 10 Tage. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, verworfen, der Zellrasen einmal mit sterilem PBS gewaschen und zum Ablösen anschließend für ca. 3 – 5 min bei 37°C mit 2,5 ml (bzw. 5 ml bei 75 cm²-Flaschen) Trypsin/EDTA-Lösung (Verdünnung 1:10 eingesetzt, PAA, Pasching, Österreich) inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die abgelösten Zellen wurden zum Abstoppen der proteolytischen Wirkung des Trypsins mit FCS-haltigem Kulturmedium versetzt und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1.200 rpm für 10 min abzentrifugiert, sodann der Überstand abgesaugt und die im Pellet enthaltenen Zellen in frischem Kulturmedium durch Auf- und Absaugen mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:3 in neue Kulturflaschen überführt und weiterkultiviert.

Für die Experimente wurden SFs der 4. – 8. Passage verwendet. Zu diesem Zeitpunkt war sichergestellt, dass sich keine Makrophagen mehr in Kultur befanden, da diese sich nicht durch die für die Fibroblasten verwendete Trypsinbehandlung ablösen. Die Fibroblasten wurden außerdem nur bis zu einer gewissen Passage verwendet, da sich ihr Genexpressionsmuster ab einem bestimmten Zeitpunkt ändert und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht mehr gewährleistet ist.¹⁴⁹

2.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um die Zellen für spätere Versuche zu konservieren und vor häufigem Passagieren zu schützen, wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Als Gefrierschutzmittel wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) eingesetzt, das in ungefrorenem Zustand zelltoxisch ist (daher sollte das Einfrieren und Auftauen rasch erfolgen). Diese Substanz verhindert die Dehydratation des Zytoplasmas und unterbindet die Ausbildung von Eiskristallen, welche die Zellmembranen zerstören und zur Lyse der Zellen führen würden.

Vor dem Einfrieren wurde das Einfriermedium, bestehend aus 10 % DMSO, 40 % FCS und 50 % serumfreiem Medium hergestellt und kühl gelagert.

Die Zellen wurden bei 80 – 90 % Konfluenz von den Gewebekulturflaschen abgelöst. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und zum Ablösen 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 3 – 5 min zugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Kompletmedium resuspendiert, 10 min bei 1.200 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml Einfrierlösung resuspendiert, in Kryoröhrchen pipettiert und bei -80°C eingefroren. Zur Lagerung wurden diese Zellen nach 48 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die tiefgefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und das Kryoröhrchen kurzzeitig bei 37°C erwärmt.

Das vorgewärmte Kompletmedium (10 ml) wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und die aufgetauten Zellen zupipettiert. Dann wurden die Zellen bei 1.200 rpm für 10 min abzentrifugiert, um das zelltoxische DMSO herauszuwaschen. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Kompletmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät.

2.4 Stimulation von RA und OA Fibroblasten

24 h vor der Stimulation mit den im Folgenden näher erläuterten Substanzen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 60 – 80 % in 25cm²-Flaschen mit serumfreiem Medium versetzt (bei ELISA vorherige Verteilung auf 96-Well-Platten; Zielgröße pro Well: 10.000 Zellen). Nach der 24-stündigen Aushungerungsperiode konnten die Zellen je nach beabsichtigtem Versuch für unterschiedlich lange Zeit (FACS-Färbung: 24h; ELISA: 12h Vorinkubation, dann Zugabe von IL-1 β (10ng/ml Endkonzentration) → Gesamtinkubationszeit 24 h) mit den entsprechenden Substanzen stimuliert werden:

- 17 β -Estradiol (Konzentrationen von 10⁻¹⁴ M bis 10⁻⁷ M; Sigma)
- Progesteron (Konzentrationen von 10⁻¹⁴ M bis 10⁻⁷ M; Sigma)
- DHT (Konzentrationen von 10⁻¹⁴ M bis 10⁻⁷ M; Sigma)
- IL-1 β (10 ng/ml; PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
- ICI 182,780 (Konzentrationen von 10⁻⁸ M bis 10⁻⁶ M; Tocris Bioscience, Ellisville, USA): Östrogenrezeptorantagonist mit hoher Affinität (IC₅₀ = 0,29 nM) ohne jegliche agonistische Aktivität in vitro und in vivo sowie hochaffiner Agonist am Östrogenmembranrezeptor GPR30

Die Substanzen wurden mit Ausnahme von IL-1 β in Ethanol (J. T. Baker, Deventer, Niederlande) gelöst und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Auf die Konzentrationen, in denen die verschiedenen Substanzen eingesetzt wurden, sowie auf die genauen Inkubationszeiten wird bei den entsprechenden Versuchserläuterungen noch genauer eingegangen.

2.5 Durchflusszytometrie (FACS) zur Messung der Integrinexpression

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen sowie intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Das Prinzip ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Zur Quantifizierung von DNA werden interkalierende Farbstoffe (ohne Antikörper) eingesetzt.

Bei dem Begriff FACS handelt es sich um eine Abkürzung für Fluorescence Activated Cell Sorting. Obwohl der Begriff FACS ein Markenname der Firma Becton Dickinson (BD) ist, hat er sich als Synonym für die Durchflusszytometrie eingebürgert.

2.5.1 Stimulation der Zellen

Zur Stimulation kamen folgende Substanzen und Konzentrationen sowie deren Kombinationen zum Einsatz:

- 17β -Estradiol in den Konzentrationen 10^{-14} M bis 10^{-7} M
- 17β -Estradiol in den Konzentrationen 10^{-14} M bis 10^{-7} M + $1\mu\text{M}$ ICI 182,780
- ICI 182,780 in den Konzentrationen 10^{-8} M bis 10^{-6} M
- Progesteron in den Konzentrationen 10^{-14} M bis 10^{-7} M
- DHT in den Konzentrationen 10^{-14} M bis 10^{-7} M
- DHT in den Konzentrationen 10^{-11} M und 10^{-8} M, jeweils kombiniert mit IL- 1β (10 ng/ml)
- IL- 1β (10 ng/ml)

Da die Substanzen mit Ausnahme von IL- 1β in Ethanol gelöst waren, wurde zur Kontrolle bei jedem Versuch pro Patient eine 25cm²-Flasche mit Ethanol in der Konzentration 10^{-9} mmol/l versetzt.

Nach 24 Stunden wurde bei allen Flaschen das Medium abgesaugt, die Zellen mit etwa 5 ml PBS gewaschen, dieses wieder abgesaugt und 2 ml Accutase (PAA, Pasching, Österreich) pro Flasche zugegeben. Bei Accutase handelt es sich um ein Enzymgemisch aus bakteriellen Kollagenasen, das laut Hersteller Membranproteine weniger stark angreift als Trypsin und sich in besonderem Maße zum Ablösen von Zellen eignet, welche sich in serumfreiem Medium befanden.

Das Ablösen der Zellen (Dauer: ca. 15 Minuten) vom Flaschenboden wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Sodann wurde die Zellsuspension in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 Minuten lang bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in etwa 700 μl eiskaltem FACS-Waschpuffer (500 ml PBS, 10% FCS, 5 ml einer 10%igen NaN_3 -Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)) aufgenommen und gründlich resuspendiert. Der Gebrauch von niedrig temperierten Reagenzien/Lösungen und die Anwesenheit von Natriumazid verhindern die Modulation und Internalisation von Oberflächenantigenen, was mit einem Verlust der Fluoreszenzintensität einhergehen würde.

2.5.2 Antikörperfärbung und Fixierung

Eine indirekte Antikörperfärbung erfordert zwei Inkubationsschritte: den ersten mit einem primären Antikörper, gefolgt von einem zweiten mit einem kompatiblen sekundären Antikörper. Der sekundäre Antikörper ist dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. FITC, PE, Cy5 etc.) konjugiert. Er dient dazu, den Primärantikörper bei der FACS-Messung sichtbar zu machen.

Jeweils 100 µl der obigen Zellsuspension wurden auf sechs 12×75 mm Rundboden-Polystyrol FACS-Röhrchen (5 ml Kapazität; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verteilt. In diesen waren unmittelbar vorher je 0,7 µg eines monoklonalen Primärantikörpers gegen die Integrinuntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\alpha v\beta 3$ und $\beta 1$ (siehe Tab. 2.2) vorgelegt worden.

Antigen	Klon	Eigenschaften	Hersteller
Integrin $\alpha 1$, CD49a	FB12	Rezeptor für Kollagen, Laminin	Millipore, Billerica, USA
Integrin $\alpha 3$, CD49c	ASC-6	Rezeptor für Laminin, Fibronectin, Kollagen	Millipore, Billerica, USA
Integrin $\alpha 5$, CD49e	SAM-1	Rezeptor für Fibronectin	Millipore, Billerica, USA
Integrin αv , CD51	272-17E6	Rezeptor u. a. für Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, MMP-2 Assoziation mit 5 verschiedenen β -Ketten ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 8$) möglich	EMD-Calbiochem, La Jolla, USA
Integrin $\alpha v\beta 3$, CD51/CD61	LM609	Rezeptor für Vitronectin, Fibronectin, Osteopontin, Bone Sialoprotein	Millipore, Billerica, USA
Integrin $\beta 1$, CD29	P4G11	Komplexbildung mit diversen α -Untereinheiten → Rezeptor u. a. für Kollagen, Fibronectin, Laminin	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Tab. 2.2: Verwendete primäre monoklonale Maus-Antikörper

Anschließend wurden die Fibroblasten mit dem Primärantikörper für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, wobei die Zellen alle 7 Minuten kurz geschüttelt wurden, um eine gleichmäßige Bindung des Antikörpers zu erreichen.

Zur Entfernung nicht gebundenen Antikörpers wurde nach der Inkubation 1 ml kalter FACS-Waschpuffer in jedes Röhrchen gegeben und die Zellsuspension über 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Währenddessen wurde eine Lösung des Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers vorbereitet. Dazu wurde polyklonaler Rabbit Anti-Mouse Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelter Antikörper 1:100 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) in gekühltem FACS-Waschpuffer verdünnt. Es ist darauf zu achten, dass gelöster Antikörper stets kühl und dunkel gelagert wird, da die an den Antikörper gekoppelten Fluorochrome lichtempfindlich sind.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die synovialen Fibroblasten in jeweils 100 µl einer Sekundärantikörperlösung (Konzentration: 5 µg/ml) resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen ein weiteres Mal für 30 Minuten unter regelmäßigem Schütteln bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Nach der Inkubation wurde zur Ablösung nicht gebundenen FITC-Antikörpers den Zellen 1 ml kalter FACS-Waschpuffer zugegeben und das Ganze anschließend für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen, die gefärbten synovialen Fibroblasten in 200 µl kaltem PBS (oder PBS mit 10% FCS und 0,1% NaN₃) resuspendiert und bis zur Messung im Dunkeln auf Eis oder im Kühlschrank gelagert. Um die besten Ergebnisse zu erzielen, wurden die Zellen entweder direkt nach der Färbung im Durchflusszytometer gemessen oder anstatt der Resuspension in PBS in 200 µl 1%igem Paraformaldehyd (in PBS verdünnte 37%ige Formaldehydlösung; Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

Dies ermöglicht es, die Zellsuspension über einen längeren Zeitraum, beispielsweise über Nacht, aufzubewahren.

Vor der Messung ist darauf zu achten, dass die Zellen gut suspendiert sind. Zu diesem Zweck ist es sinnvoll, jedes Röhrchen kurz zu vortexen, bevor es in das FACS-Gerät eingesetzt wird.

2.5.3 Ausmessen mittels Durchflusszytometer/FACS-Analyse

2.5.3.1 Messprinzip und Aufbau

Grundlage einer FACS-Analyse ist eine (gefärbte) Einzelzellsuspension, die einen fokussierten Laserstrahl passiert. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Bei der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die Durchflussszelle (flow cell), in der sie durch Laserlicht (488 nm Argonlaser) angeregt werden. Detektiert wird zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore.

2.5.3.2 Lichtstreuung und Fluoreszenzmessung

2.5.3.2.1 Lichtstreuung

Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Solange der Laserstrahl ungehindert durch die Flusszelle geht, entsteht kein Streulicht. Quert hingegen eine Zelle den Strahl, wird das Licht in verschiedenste Richtungen gestreut. Gemessen wird das Streulicht meist an 2 Stellen:

- a) (fast) in Richtung des ursprünglichen Strahls (Vorwärtsstreulicht) und
- b) etwa im 90°-Winkel zum ursprünglichen Strahl (Seitwärtsstreulicht)

Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und ihrer Komplexität. So streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die sehr glatten B- oder T-Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits ungefärbt recht gut unterscheiden.

Um die Streulicht-Messergebnisse zu verdeutlichen, werden die Zellen in einer Grafik, einem sog. DotPlot, dargestellt. Dabei ist auf der x-Achse das Vorwärts- und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen.

Um nur die Region von Interesse im DotPlot aufgezeigt zu bekommen, wird eine weitere wichtige Auswertetechnik der Durchflusszytometrie angewandt: das Gaten, das Setzen eines Analysefensters. Dabei wird eine bestimmte Zellpopulation eingegrenzt, in unserem Fall die synovialen Fibroblasten, die dann selektiv auf ihre Fluoreszenz hin

untersucht wird. Man gibt also dem Computerprogramm die wichtige Region (R1) im Streulichtdiagramm an, so dass nur Zellen dieser Region im Fluoreszenz-Dot-Plot dargestellt werden (siehe Abb. 2.1).

2.5.3.2.2 Fluoreszenzmessung

Zugleich mit dem gestreuten Licht kann man im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben messen.

Fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome) absorbieren Lichtenergie über einen bestimmten Wellenlängenbereich. Die absorbierte Energie hebt die Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Rücksprung auf das Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Das dabei ausgesendete Fluoreszenzlicht hat eine längere Wellenlänge als das absorbierte Licht, da ein Teil der Energie als Wärme verloren geht. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Das in diesem Versuch als Fluoreszenzfarbstoff verwendete Fluoresceinisothiocyanat hat sein Absorptionsmaximum bei 485 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 514 nm. Die FITC-Markierung entspricht damit einer Grünfluoreszenz und wird auf der x-Achse dargestellt.

2.5.4 Auswertung der Messdaten

Für die FACS-Messung wurde das Durchflusszytometer Coulter®EPICS®XL-MCL™ (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet, das mit einem Rechner zur Datenakquisition und -analyse verbunden war. Bei jeder Probe wurden die Daten von mindestens 10.000 Zellen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit den Softwareprogrammen EXPO32 ADC und WinMDI Version 2.9 (Windows Multiple Document Interface, Flow Cytometry Application, Joseph Trotter, Scripps Research Institute, USA). Die Daten wurden als zweidimensionale Punkt-Bilder (DensityPlots), bei denen im Gegensatz zu einfachen DotPlots Regionen höherer Dichte zusätzlich eine andere Farbe aufweisen, und als eindimensionale Histogramme dargestellt. Das Gaten der synovialen Fibroblasten erfolgte in Form von logarithmischen Skalen auf der Basis ihrer Forward- und Sideward-Scatter-Signale.

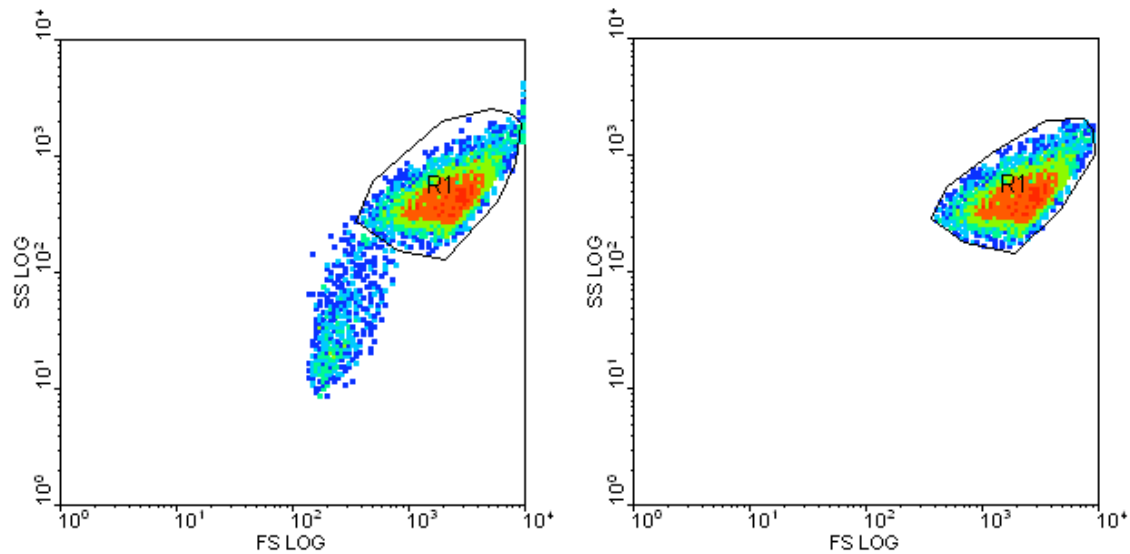


Abb. 2.1: Setzen eines Analysefensters (R1) im DensityPlot (Gaten)

Die Fluoreszenzsignale (FL1) wurden nur von den Zellen erfasst, die sich in der festgelegten Analyseregion R1 befanden, um die Signale von Zellagglutinen und -trümmern auszuschließen.

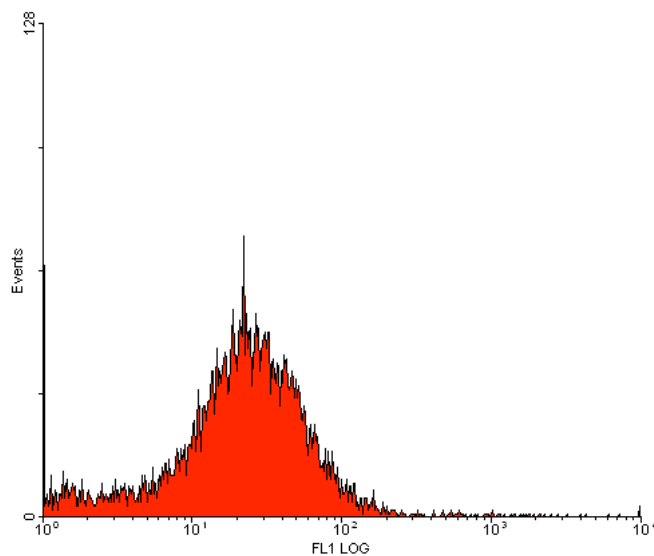


Abb. 2.2: Als Histogramm dargestelltes Fluoreszenzsignal der Zellen aus R1

Die X-Achse gibt hier die Fluoreszenzintensität wider, die Y-Achse die Zellzahl.

Mit Hilfe der WinMDI Software konnten neben den Variationskoeffizienten (CV) die geometrischen Mittel der Fluoreszenzwerte (GMean) der ausgewählten Subpopulation ermittelt werden (siehe Abb. 2.3).

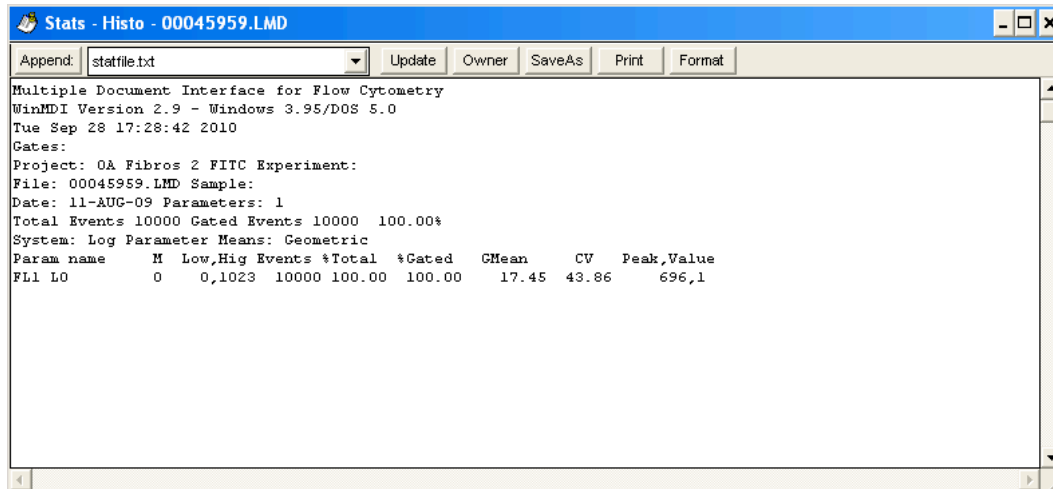


Abb. 2.3: Datenfile aus der WinMDI Software zum obigen Histogramm

Neben der Anzahl der gezählten Zellen sind das geometrische Mittel der Fluoreszenzwerte (GMean), der Variationskoeffizient (CV) sowie das Maximum der Fluoreszenzintensität dargestellt.

Es wurden die jeweiligen geometrischen Mittel der Fluoreszenzwerte in Beziehung zum GMean-Wert der Ethanolkontrolle gesetzt und dann ausgedrückt in Prozentwerten zur statistischen Auswertung in SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) überführt.

2.6 ELISA zur Bestimmung der IL-6 Ausschüttung nach Stimulation

2.6.1 Präparation/Vorbereitung der synovialen Fibroblasten

Nach einer 24-stündigen Aushungerungsperiode wurden die Fibroblasten mit folgenden Substanzen für 12 h vorinkubiert:

- 17 β -Estradiol in den Konzentrationen 10^{-11} M bis 10^{-7} M
- Progesteron in den Konzentrationen 10^{-11} M bis 10^{-7} M
- Dihydrotestosteron in den Konzentrationen 10^{-11} M bis 10^{-7} M

Als Kontrolle wurde mit Ethanol in der Endkonzentration 10^{-9} mmol/l stimuliert.

Nach 12 h wurde IL-1 β mit einer Endkonzentration von 10 ng/ml in die entsprechenden Wells gegeben, da IL-1 β die IL-6-Freisetzung bedingt. Anschließend wurde für weitere 12 h im Brutschrank inkubiert.

Nach der Gesamtinkubationszeit von 24 h konnten die Überstände in den Wells abgenommen werden und wiederum analog auf 96-Well-Platten verteilt werden. Zur Lagerung wurden die Zellkulturüberstände bei -20°C tiefgefroren.

2.6.2 Durchführung des ELISA

ELISA ist eine Abkürzung für Enzyme-linked Immunosorbent Assay und beschreibt ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein eines Antigens. Das sog. Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann dann durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISAs auch für quantitative Nachweise gebraucht werden können.

2.6.2.1 Verwendete Materialien

Zur Durchführung dieser Versuchsreihe wurde das humane IL-6 ELISA Set von BD Biosciences (BD OptEIA™ Set Human IL-6, BD Biosciences, San Diego, USA) verwendet.

Die im Folgenden genannten Lösungen wurden vor jedem Versuch frisch hergestellt und bei 2-8°C gelagert.

- Beschichtungspuffer (0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5):
7,13 g NaHCO_3 (Merck, Darmstadt, Deutschland), 1,59 g Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt, Deutschland), gelöst in 1 l Millipore-Wasser → pH-Einstellung mit 1 M NaOH (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Assay-Lösung: PBS mit 10 % FCS (PAA, Pasching, Österreich), pH 7,0
- Waschpuffer: PBS mit 0,05 % Tween-20 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Substratlösung: TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences, San Diego, USA)
- Stopplösung: 2 N H_2SO_4 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Als 96-Well-Platten wurden die „96 Well Optical Bottom Plates auf Polymer Basis“ der Firma NUNC (Rochester, USA) benutzt. Zur photometrischen Ausmessung kam ein Microplate Reader von Molecular Devices (EMax Endpoint ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Ismaning, Deutschland) zusammen mit der zugehörigen Datenakquisitions- und Analysesoftware SoftMax zum Einsatz.

2.6.2.2 Vorbereitung und Handhabung der Standards und Proben

Standards: Nachdem der lyophilisierte Standard aus dem IL-6 ELISA-Set auf Raumtemperatur gebracht worden war, wurde er mit 1 ml deionisiertem Wasser rekonstituiert, für 15 Minuten zum Equilibrieren stehen gelassen und anschließend behutsam mit dem Vortexer gemischt.

Der Standard wurde dann schrittweise auf Verdünnungen von 300 pg/ml, 150 pg/ml, 75 pg/ml, 37,5 pg/ml, 18,8 pg/ml, 9,4 pg/ml und 4,7 pg/ml gebracht, welche letztendlich zur Erstellung einer Eichkurve dienten. Als Nullkontrolle (0 pg/ml) wurde Assaylösung verwendet.

Proben: Zur Herstellung der Proben wurden jeweils 10 µl der aufgetauten Überstände mit 190 µl Assaylösung versetzt.

2.6.2.3 Anwendung der Sandwichmethode

Aus den verschiedenen ELISA-Methoden wurde zur IL-6 Bestimmung der Sandwich-ELISA ausgewählt (siehe Abb. 2.4). Die Sandwichmethode misst die Menge Antigen zwischen zwei Lagen von Antikörpern. Dieses Prinzip setzt voraus, dass das Antigen mindestens zwei Bindungsstellen für verschiedene Antikörper besitzt. Es eignet sich besonders dann sehr gut, wenn die Konzentration des Antigens gering ist oder eine hohe Konzentration anderer Antigene eine Probe kontaminiert.

Schrittweises Vorgehen:

1. Bei der Anwendung dieses Assays wird ein sogenannter Fangantikörper (capture antibody), der gegen humanes IL-6 gerichtet ist, in den 96-Well-Platten vorgelegt. Zum Einsatz kamen pro Well 100 μ l eines im Verhältnis 1:250 in Beschichtungspuffer gelösten Fangantikörpers. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm (American National Can Company, Greenwich, USA) umwickelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei bindet der Fangantikörper an die Böden der 96-Well-Platten.
2. Sodann wurde dreimal mit ≥ 300 μ l/Well Waschpuffer gewaschen und nach dem letzten Waschvorgang die Platte umgedreht und auf Saugpapier ausgeklopft, um jeglichen restlichen Waschpuffer zu entfernen.
3. Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse wurden im nächsten Schritt die ungebundenen Stellen für 1 h bei Raumtemperatur mit ≥ 200 μ l/Well Assaylösung geblockt.
4. Daraufhin erfolgte erneutes dreimaliges Waschen, wie in Schritt 2 beschrieben.
5. Nun wurden die Standard- und Probenlösungen, wie in Punkt 2.6.2.2 beschrieben, hergestellt.
6. Als nächstes wurden jeweils 100 μ l von jedem Standard und jeder Probe in die zugehörigen Wells pipettiert. Sodann erfolgte die Versiegelung mit Parafilm und eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur, während der das Antigen an den Fangantikörper binden konnte.
7. Der folgende Waschvorgang umfasste fünf Waschschrte anstelle der vorherigen drei.
8. Im Anschluss wurden 100 μ l Working Detector in jedes Well gegeben und die Platten in versiegeltem Zustand für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Working Detector enthält sowohl den biotinylierten Detektionsantikörper

(1:250 verdünnt in Assaylösung), als auch das Enzymkonjugat aus Streptavidin und Meerrettichperoxidase (1:250 verdünnt in der Detektionsantikörperlösung). Streptavidin ist ein Protein, das mit jeder seiner vier Untereinheiten mit sehr hoher Affinität jeweils ein Biotinmolekül binden kann. An Streptavidin wiederum ist Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welche die enzymatische Umwandlung von Tetramethylbenzidin (TMB) katalysiert.

9. Hierauf erfolgte die nächste Waschphase mit sieben Waschvorgängen, wobei der Waschpuffer hier jeweils für eine halbe bis eine Minute im Well verbleiben sollte.
10. Als nächstes wurden jedem Well 100 µl Substratlösung beigelegt und die Platten für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur ins Dunkle gestellt. Das enthaltene TMB wurde während dieser Zeit von der HRP gespalten, so dass sich ein türkiser bis blauer Farbton zeigte. Schon geringe Enzymmengen würden über einen längeren Zeitraum das vorhandene Reagenz komplett spalten. Alle Proben hätten dann die gleiche optische Dichte. Darum muss die Reaktion nach einer definierten Zeit, sobald die Kontraste suffizient zur Darstellung kommen, abgebrochen werden.
11. Dazu wurden jeweils 50 µl Stopplösung zugegeben und damit das Enzym zerstört. Es zeigte sich ein Farbumschlag von blau zu gelb.

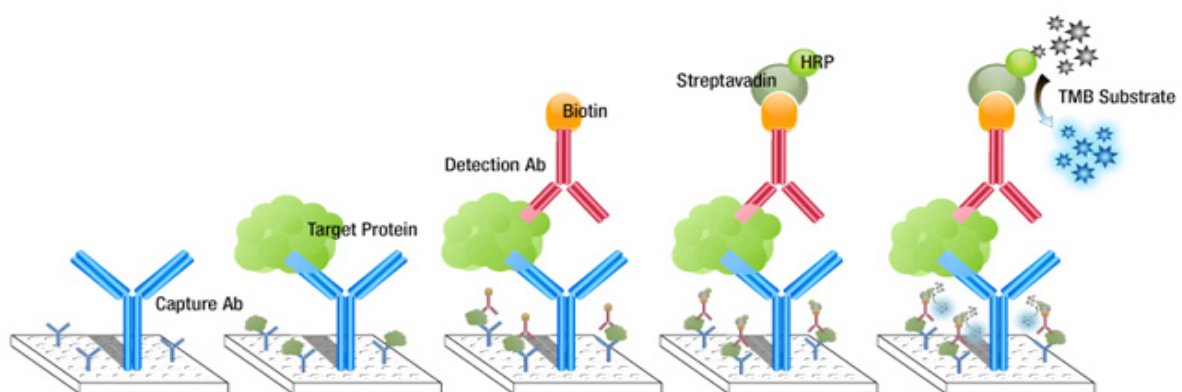


Abb. 2.4: Darstellung der Sandwich-Technik

Quelle: www.epitomics.com/images/products/sandwich.jpg

2.6.2.4 Quantifizierung des Signals

Die Quantifizierung des Signals erfolgte durch photometrische Bestimmung bei der entsprechenden Wellenlänge von 450 nm. Dazu wurden direkt nach der Stoppreaktion (längstens jedoch 30 Minuten danach) die Platten in den Microplate Reader von Molecular Devices gelegt und so die optische Dichte jeder Probe gemessen.

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Die jeweiligen geometrischen Mittel aus der Fluoreszenzmessung bzw. die mittels Microplate Reader bestimmten optischen Dichtewerte wurden dazu in Beziehung zur Ethanolkontrolle gesetzt und dann ausgedrückt in Prozentwerten mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test verglichen. Die Daten werden im Ergebnisteil als vertikale Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Sie wird durch das obere und das untere Quartil (25% und 75% Quartil) begrenzt. Der Median ist als durchgehender Strich in der Box eingezeichnet. Die Begrenzungen der „Whiskers“ repräsentieren die zehnte und neunzigste Perzentile. Als 100%-Kontrollniveau fand die jeweilige Integrinexpression bei den lediglich mit Ethanol stimulierten Fibroblasten Verwendung.

P-Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen der Expression des Integrins $\beta 1$ und der IL-6 Produktion kam die Rangkorrelation nach Spearman zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Dihydrotestosteron

3.1.1 FACS-Analyse des Einflusses von Dihydrotestosteron auf die Integrinexpression synovialer Fibroblasten von OA und RA Patienten im Vergleich

3.1.1.1 Integrin alpha1

Bei **OASFs** konnte man ab einer Konzentration von 10^{-13} M eine verstärkte Expression beobachten (nicht abgebildet), die bei 10^{-9} M mit einem Median von 109% ihren Höhepunkt erreichte ($p < 0,05$), um dann bei 10^{-7} M wieder annähernd auf das Kontrollniveau zu fallen. Unter zusätzlicher Gabe des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β zeigt sich eine ausgeprägtere Expression des Integrins alpha1, die bei einer DHT-Konzentration von 10^{-8} M im Median 117% betrug ($p < 0,001$). Unter alleiniger Gabe von IL-1 β fand sich die stärkste Integrinexpression mit 125% in Bezug zur Ethanolkontrolle ($p < 0,05$).

Im Vergleich dazu konnte man bei **RASFs** in den Konzentrationen 10^{-11} M und 10^{-10} M noch eine verminderte Expression erkennen, die sich ab einer Konzentration von 10^{-9} M mit einem Maximum von 112% bei 10^{-8} M ($p < 0,05$) in eine relativ zur Kontrolle vermehrte Expression wandelte. Im Falle einer Kombination von IL-1 β und DHT fanden sich sowohl bei einer DHT-Konzentration von 10^{-11} M als auch bei einer Konzentration von 10^{-8} M signifikante Mehrexpressionen ($p < 0,05$) mit einem Median von 138% bei 10^{-11} M. Die alleinige Stimulation mit IL-1 β ergab ebenfalls eine signifikante, verstärkte Expression mit einem Median von 121% ($p < 0,05$) (Abb. 3.1).

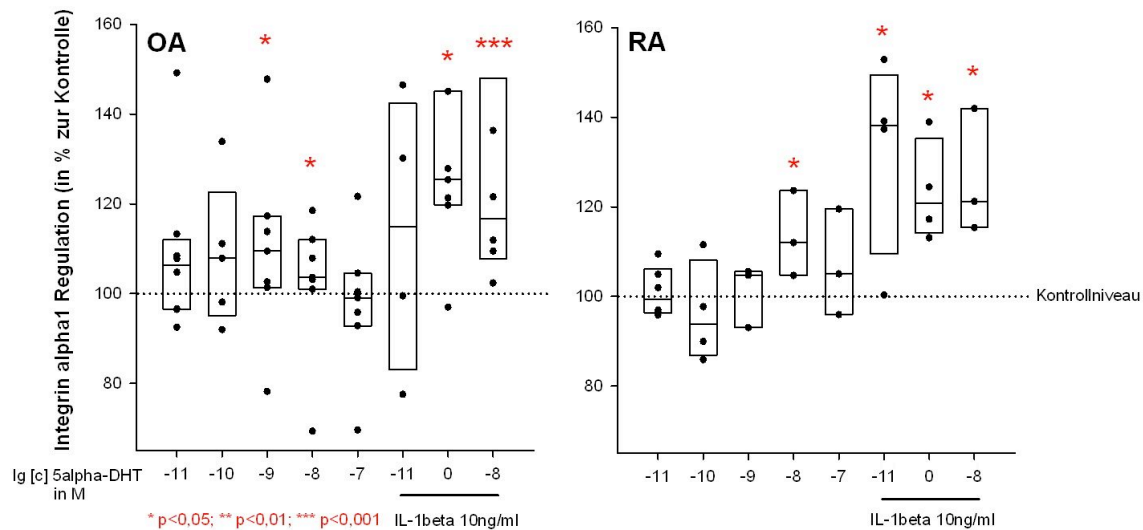


Abb. 3.1: Regulation des Integrins alpha1 unter Dihydrotestosteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-11} M, n=8; 10^{-10} M, n=5; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, n=7; 10^{-11} M + IL-1 β , n=4; IL-1 β , n=7; 10^{-8} M + IL-1 β , n=6; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-11} M, n=6; 10^{-10} M, n=4; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, n=3; 10^{-11} M + IL-1 β , n=4; IL-1 β , n=4; 10^{-8} M + IL-1 β , n=3; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

3.1.1.2 Integrin alpha3

Bei **OASFs** zeigte sich keine signifikante Veränderung der Integrin alpha3 Spiegel nach Hormongabe. Auffällig war die Reduktion der Integrinexpression unter Einsatz des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β . So ließ sich unter Verwendung von 10 ng/ml ohne Zusatz von DHT ein Median von 77% erkennen ($p<0,05$).

Diese Beobachtungen bestätigten sich auch bei **RASFs**, jedoch nur mit einem Trend zur Signifikanz ($p=0,082$) (Abb.3.2).

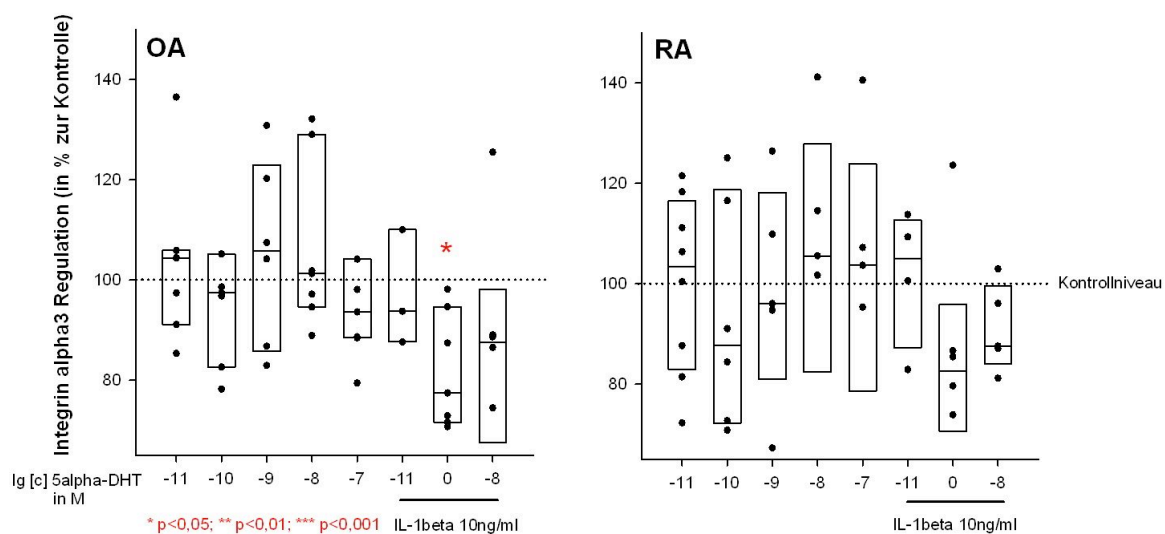


Abb. 3.2: Regulation des Integrins alpha3 unter Dihydrotestosteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=7$; 10^{-9} M, $n=6$; 10^{-8} M bis 10^{-7} M, $n=7$; 10^{-11} M + IL-1 β , $n=3$; IL-1 β , $n=7$; 10^{-8} M + IL-1 β , $n=6$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-11} M, $n=8$; 10^{-10} M, $n=6$; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, $n=5$; 10^{-11} M + IL-1 β , $n=4$; IL-1 β , $n=6$; 10^{-8} M + IL-1 β , $n=5$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

3.1.1.3 Integrin alpha5

Im Konzentrationsbereich 10^{-11} M bis 10^{-7} M zeigte sich bei **OASFs** durchweg ein Trend zur Verstärkung der Integrinexpression, bei 10^{-9} M signifikant (Median von 105% ($p < 0,05$)).

Im Gegensatz dazu fand sich bei **RASFs** bei 10^{-9} M eine signifikante Reduktion des Integrins $\alpha 5$ auf 90% ($p < 0,05$) im Vergleich zur Ethanolkontrolle.

Außerdem konnte eine erhöhte Integrinexpression von 119% im Vergleich zur Ethanolkontrolle bei Einsatz von proinflammatorischem IL-1 β beobachtet werden ($p = 0,065$). Bei zusätzlicher Stimulation mit DHT in einer Konzentration von 10^{-8} M wurde dieser Effekt zum Teil wieder aufgehoben ($p = 0,002$) (Abb. 3.3).

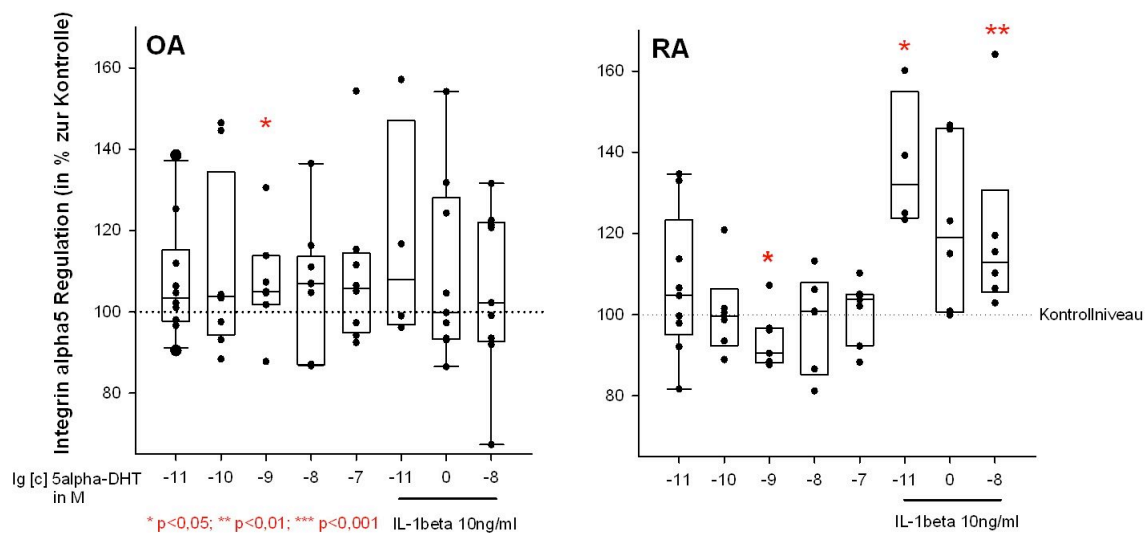


Abb. 3.3: Regulation des Integrins alpha5 unter Dihydrotestosteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-11} M, n=10; 10^{-10} M, n=8; 10^{-9} M, n=7; 10^{-8} M, n=9; 10^{-7} M, n=8; 10^{-11} M + IL-1 β , n=4; IL-1 β , n=9; 10^{-8} M + IL-1 β , n=9; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-11} M, n=9; 10^{-10} M, n=6; 10^{-9} M, n=7; 10^{-8} M, n=6; 10^{-7} M, n=7; 10^{-11} M + IL-1 β , n=4; IL-1 β , n=6; 10^{-8} M + IL-1 β , n=6; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.1.1.4 Integrin alphav

Die Werte der Expression des Integrins α_v lagen bei nahezu allen Konzentrationen in der Gruppe der **OASFs** annähernd auf dem Kontrollniveau. Auffällig war die signifikante Erhöhung des Integrins auf 116% ($p < 0,05$) nach Stimulation mit 10^{-11} M DHT in Kombination mit 10 ng/ml IL-1 β . Eine Stimulation mit dem Zytokin alleine zeigte nur eine marginale Abweichung vom Kontrolllevel.

Ein nahezu identisches Bild ergab sich bei der Untersuchung der Wirkung auf **RASFs**. Hierbei zeigte sich eine noch ausgeprägtere Hochregulation auf 135% im Median unter 10^{-11} M DHT plus 10 ng/ml IL-1 β ($p < 0,05$).

DHT alleine bewirkte bei RASFs in den Konzentrationen 10^{-11} und 10^{-9} M eine signifikante Reduktion des Integrins α_v ($p < 0,05$). Bei DHT-Konzentrationen von 10^{-10} M und 10^{-8} M fand sich eine Tendenz zur Signifikanz ($p = 0,051$) (Abb. 3.4).

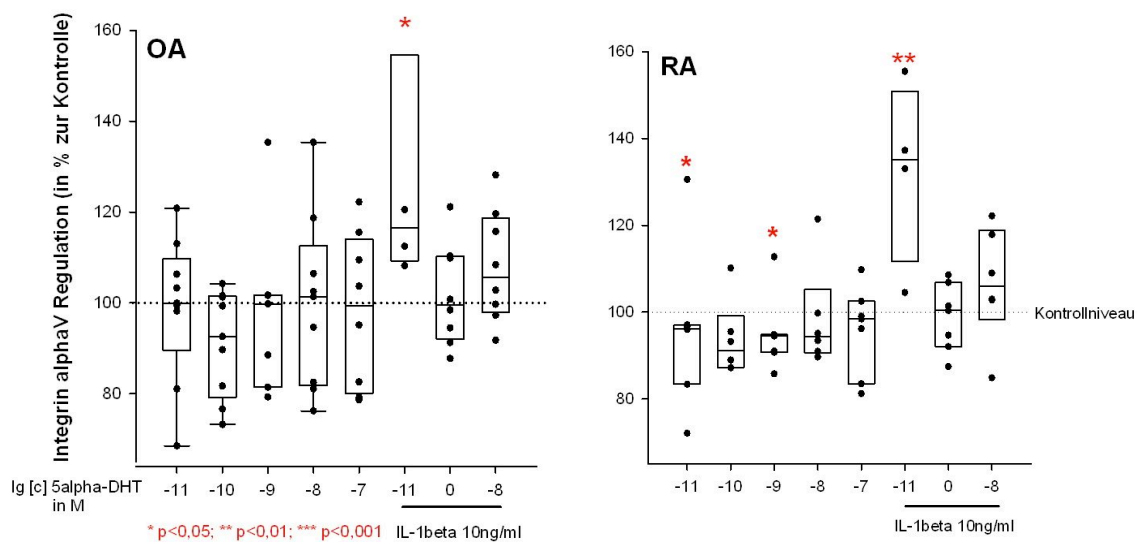


Abb. 3.4: Regulation des Integrins alphav unter Dihydrotestosteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-11} M bis 10^{-10} M, n=9; 10^{-9} M, n=7; 10^{-8} M, n=9; 10^{-7} M, n=8; 10^{-11} M + IL-1 β , n=4; IL-1 β , n=8; 10^{-8} M + IL-1 β , n=8; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-11} M, n=7; 10^{-10} M, n=6; 10^{-9} M, n=7; 10^{-8} M, n=6; 10^{-7} M, n=7; 10^{-11} M + IL-1 β , n=4; IL-1 β , n=7; 10^{-8} M + IL-1 β , n=6; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten

3.1.1.5 Integrin alphavbeta3

Auch bei der Untersuchung der Regulation des Integrins $\alpha\text{v}\beta 3$ nach Stimulation mit 10^{-11} M DHT und 10 ng/ml IL-1 β fielen sowohl bei **OASFs** als auch bei **RASFs** hohe Medianwerte im Vergleich zur Kontrolle auf, die bei Erstgenannten 113% ($p<0,05$) und bei Letzteren 133% (nicht-signifikant) erreichten. Hierbei fanden sich unter alleiniger Stimulation mit IL-1 β Ergebnisse unter Kontrollniveau.

Außerdem konnte bei OASFs und RASFs bei einer Konzentration von 10^{-9} M DHT eine Reduktion der Integrinexpression beobachtet werden (Abb. 3.5).

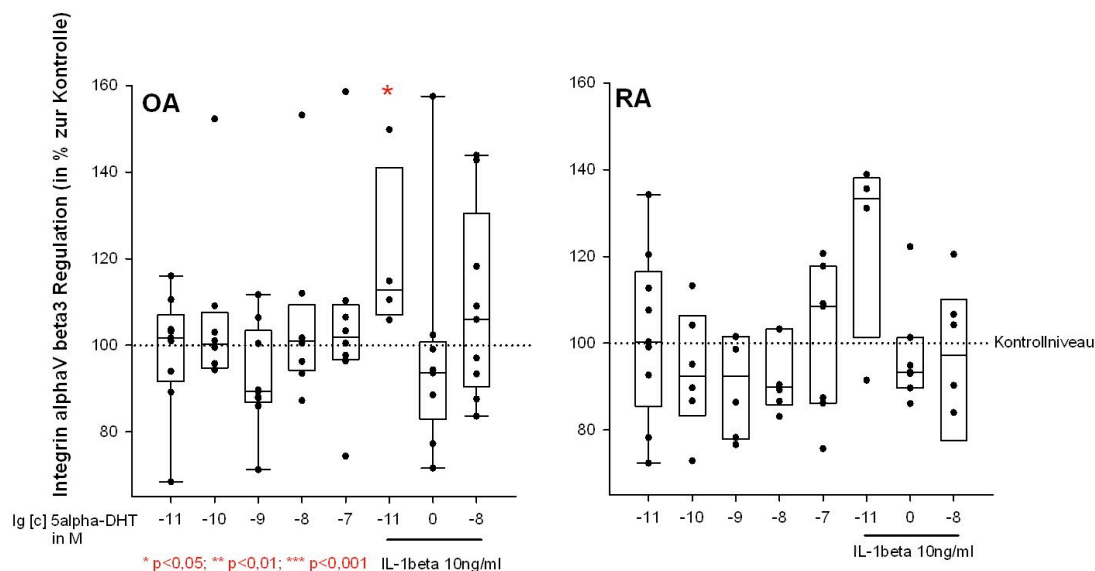


Abb. 3.5: Regulation des Integrins alphavbeta3 unter Dihydrotestosteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-11} M, n=9; 10^{-10} M, n=8; 10^{-9} M, n=9; 10^{-8} M bis 10^{-7} M, n=8; 10^{-11} M + IL-1 β , n=4; IL-1 β , n=9; 10^{-8} M + IL-1 β , n=9; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-11} M, n=9; 10^{-10} M bis 10^{-8} M, n=6; 10^{-7} M, n=7; 10^{-11} M + IL-1 β , n=4; IL-1 β , n=7; 10^{-8} M + IL-1 β , n=6; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

3.1.1.6 Integrin beta1

In den üblichen physiologischen Konzentrationen (10^{-9} M bei Männern, 10^{-11} bis 10^{-9} M bei Frauen) zeigte sich bei **OASFs** eine signifikante Verringerung der Expression ($p < 0,05$ bei 10^{-9} M) des Integrins $\beta 1$. Bei den anderen beiden Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-11} M bestand eine Tendenz zur Signifikanz ($p = 0,068$). Kombinierte man dagegen DHT 10^{-11} M mit IL- 1β 10 ng/ml, so erfolgte eine signifikante Erhöhung der Integrinexpression auf 124% in Bezug zur Ethanolkontrolle ($p < 0,001$).

Bei den **RASFs** zeigte sich eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Expression von $\beta 1$ sowohl bei einer DHT-Konzentration von 10^{-9} M (auf 89%) als auch bei einer Konzentration von 10^{-10} M (auf 79%) und 10^{-11} M (Median bei 97%).

Wie auch schon bei der Gruppe der OASFs fand sich bei einer gemeinsamen Stimulation mit DHT 10^{-11} M und 10 ng/ml IL- 1β eine signifikante Hochregulation ($p < 0,05$) auf einen Median von über 120%. Die Kombination von IL- 1β mit DHT 10^{-8} M erhöhte die Integrinexpression signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 3.6).

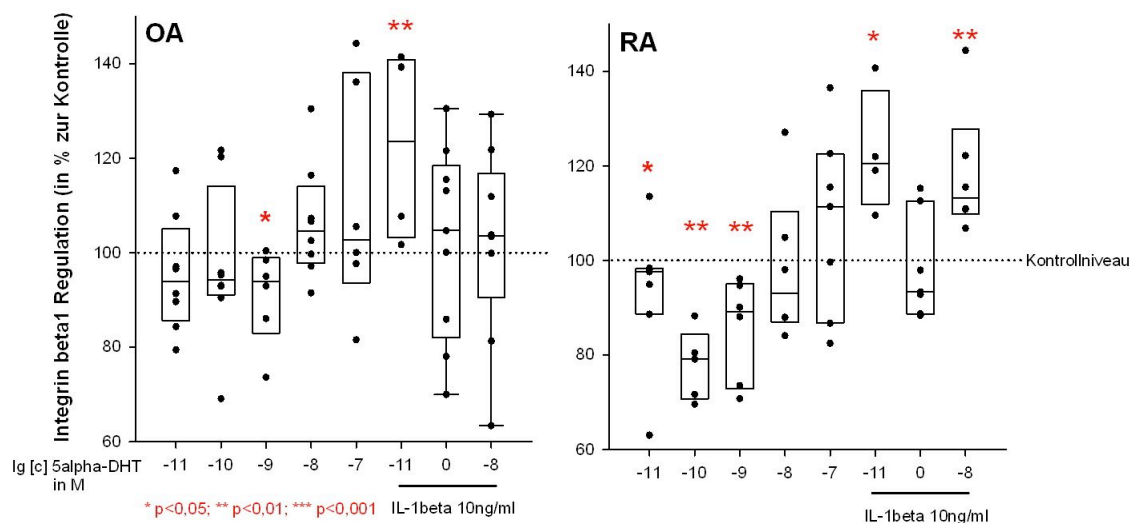


Abb. 3.6: Regulation des Integrins beta1 unter Dihydrotestosteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=8$; 10^{-9} M, $n=6$; 10^{-8} M, $n=8$; 10^{-7} M, $n=6$; 10^{-11} M + IL- 1β , $n=4$; IL- 1β , $n=9$; 10^{-8} M + IL- 1β , $n=9$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-11} M, $n=7$; 10^{-10} M, $n=5$; 10^{-9} M bis 10^{-8} M, $n=6$; 10^{-7} M, $n=7$; 10^{-11} M + IL- 1β , $n=4$; IL- 1β , $n=7$; 10^{-8} M + IL- 1β , $n=6$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.1.2 Untersuchung der IL-6 Produktion von OASF und RASF mittels ELISA nach Stimulation mit DHT

Untersuchte man die IL-6 Menge im Überstand der Fibroblasten, so fand man sowohl bei **OASFs** als auch bei **RASFs** in den DHT-Konzentrationen 10^{-8} M bis 10^{-11} M eine Suppression der IL-6 Produktion im Vergleich zur Ethanolkontrolle. Bei OASFs konnte man bei 10^{-9} M eine signifikante Hemmung auf einen Median von 84% ($p<0,05$) beobachten, bei 10^{-8} M (Median bei 87%) und 10^{-10} M (Median bei 84%) ließ sich eine Tendenz zur Signifikanz erkennen ($p=0,065$). Bei RASFs inhibierte DHT die IL-6 Produktion in den Konzentrationen 10^{-9} M (Median bei 87%, $p<0,05$) und 10^{-10} M (Median bei 80%, $p<0,05$) (Abb. 3.7).

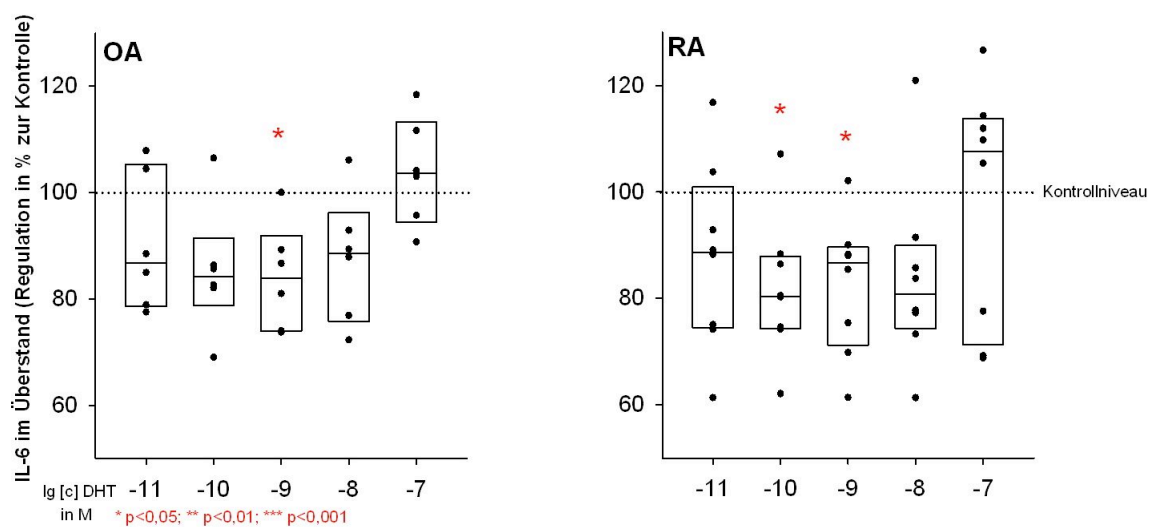


Abb. 3.7: Interleukin-6 im Überstand unter Dihydrotestosteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): $n=6$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): $n=8$; Kontrollniveau: IL-6 Ausschüttung der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

3.1.3 Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion

Das Integrin $\beta 1$ ist die signaltransduzierende Untereinheit in Integrinheterodimeren. Die über dieses Integrin initiierte Signaltransduktion führt zur Produktion von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Faktoren.⁴² Um zu überprüfen, ob die inhibierende Wirkung von DHT auf die Zytokinproduktion durch die Reduktion von $\beta 1$ Integrin bedingt wird, wurden beide Zielgrößen miteinander korreliert. Je höher dabei die Expression von Integrin $\beta 1$ auf der Zelle war, desto mehr IL-6 wurde sezerniert. Dies war signifikant bei RA ($p < 0,05$) und zeigte einen Trend zur Signifikanz bei OA ($p = 0,09$) (Abb. 3.8).

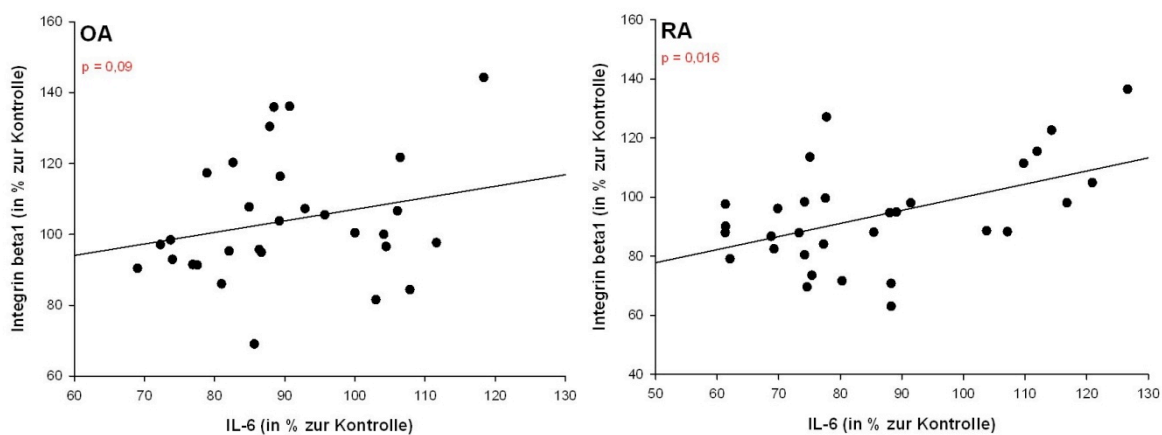


Abb. 3.8: Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion

Korrelation der Daten der beta1 Integrinexpression nach Stimulation mit DHT in den Konzentrationen 10^{-11} M bis 10^{-7} M mit denen der IL-6 Produktion mittels Spearman Korrelation.

3.2 Progesteron

3.2.1 FACS-Analyse des Einflusses von Progesteron auf die Integrinexpression synovialer Fibroblasten von OA und RA Patienten im Vergleich

3.2.1.1 Integrin alpha1

Es zeigten sich weder bei **OASFs** noch bei **RASFs** signifikante Einflüsse von Progesteron auf die Integrin $\alpha 1$ Expression. Allerdings konnte insbesondere in der Gruppe der OA Patienten ein stetiger Anstieg der Integrinexpression bis zu einer Konzentration von 10^{-8} M beobachtet werden, der dann bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration wieder in eine Reduktion überging (Abb. 3.9).

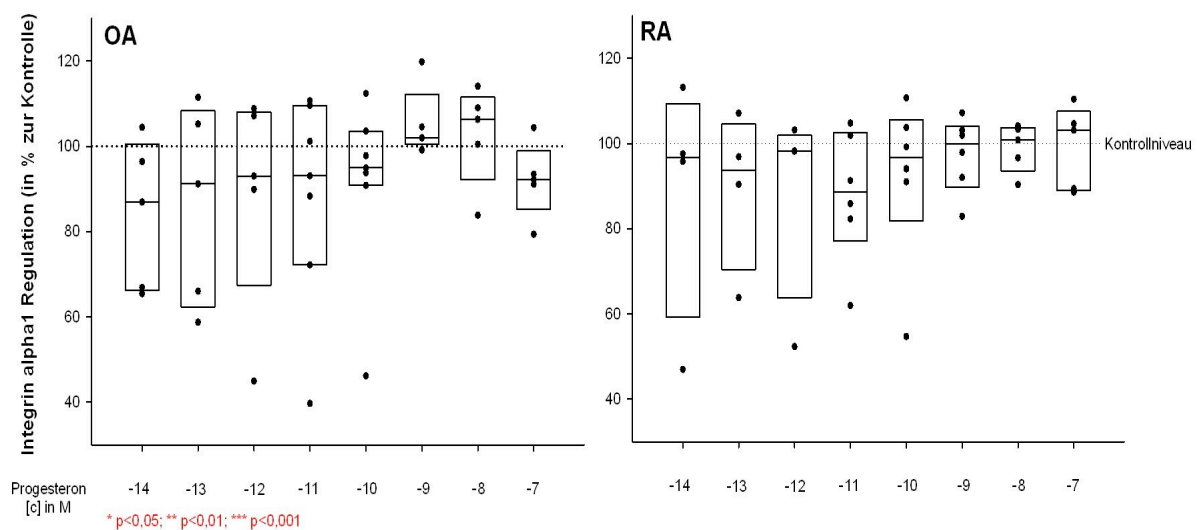


Abb. 3.9: Regulation des Integrins alpha1 unter Progesteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-14} M bis 10^{-12} M, n=5; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, n=7; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, n=5; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-14} M bis 10^{-12} M, n=4; 10^{-11} M bis 10^{-9} M, n=6; 10^{-8} M bis 10^{-7} M, n=5; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

3.2.1.2 Integrin alpha3

Bei **OASFs** ließ sich eine signifikante Reduktion von $\alpha 3$ in der Konzentration 10^{-14} M (Median bei 88%, $p < 0,05$) und eine tendenziell signifikante Verringerung der Expression bei 10^{-7} M (Median bei 76%, $p = 0,100$) beobachten.

Bei **RASFs** zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bei der $\alpha 3$ Expression nach Progesteron Gabe (Abb. 3.10).

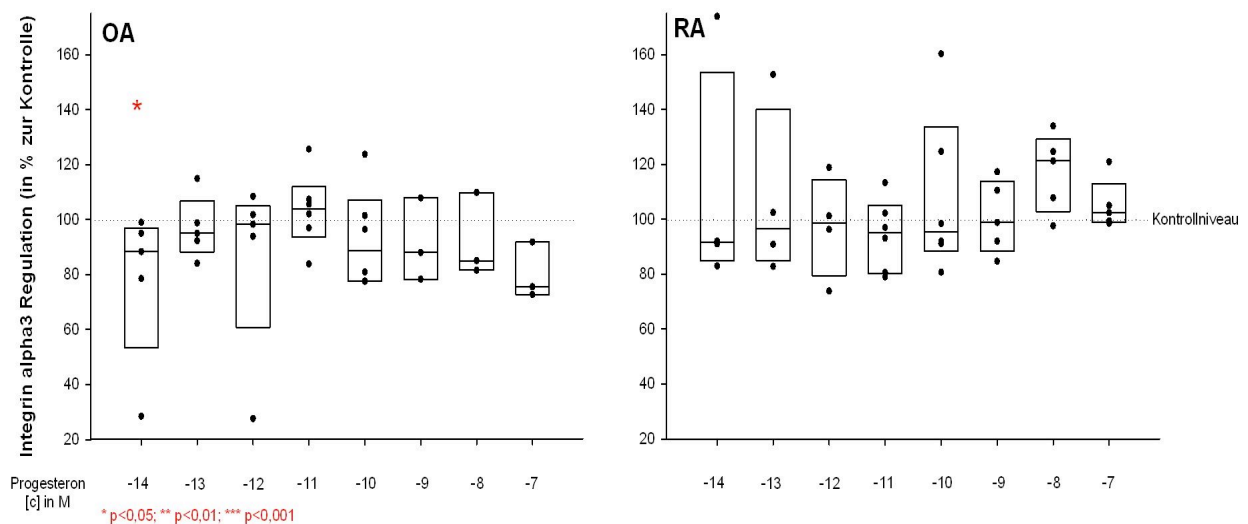


Abb. 3.10: Regulation des Integrins alpha3 unter Progesteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=5$; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=6$; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, $n=3$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=4$; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=6$; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, $n=5$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.2.1.3 Integrin alpha5

Bei **OASFs** bewirkte die Stimulation mit 10^{-9} M und 10^{-7} M Progesteron (Median bei 107%, $p < 0,05$ bzw. Median bei 109%, $p < 0,05$) eine signifikante Erhöhung der Integrin $\alpha 5$ Expression auf der Zelloberfläche. Bei **RASFs** zeigte sich kein Einfluss von Progesteron auf Integrin $\alpha 5$ (Abb. 3.11).

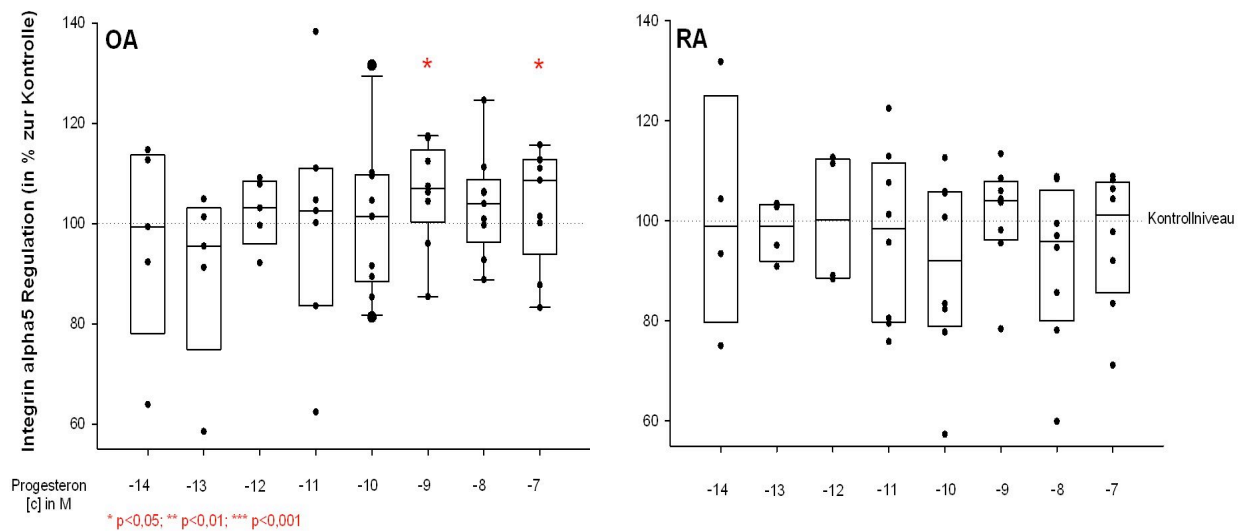


Abb. 3.11: Regulation des Integrins alpha5 unter Progesteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=5$; 10^{-11} M, $n=7$; 10^{-10} M, $n=10$; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, $n=9$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=4$; 10^{-11} M bis 10^{-7} M, $n=8$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.2.1.4 Integrin α_v

Die Stimulation mit Progesteron führte bei **OASFs** in der Konzentration 10^{-14} M zu einer signifikanten Erhöhung des Integrins α_v auf der Zelloberfläche (Median bei 108%, $p < 0,05$). Erhöhte man die eingesetzte Progesteronkonzentration, waren diese Effekte auf die Integrin α_v Expression nicht mehr feststellbar.

Bei **RASFs** konnten keine Effekte von Progesteron auf die α_v Expression beobachtet werden (Abb. 3.12).

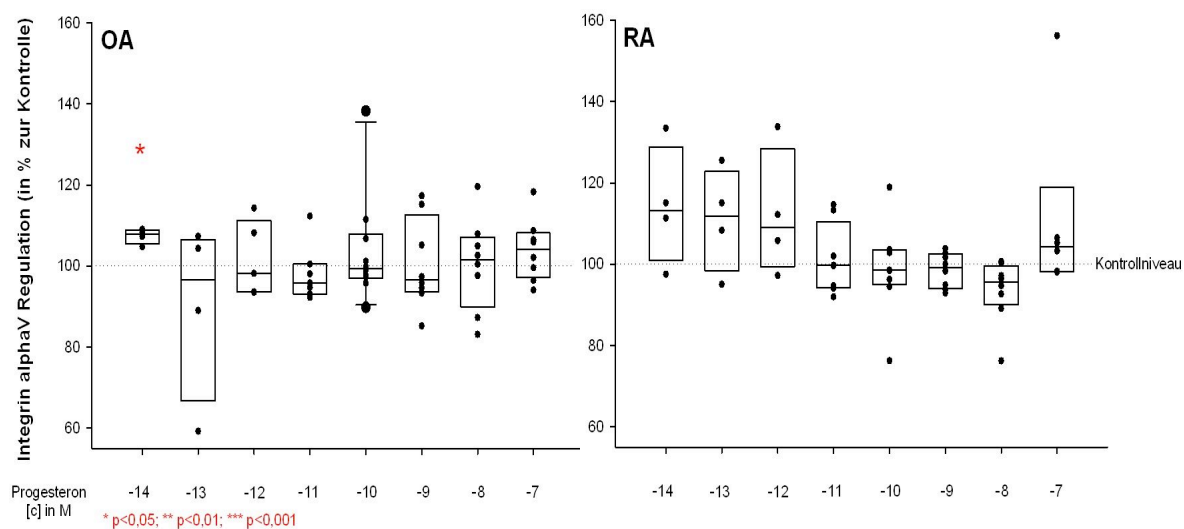


Abb. 3.12: Regulation des Integrins α_v unter Progesteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-14} M bis 10^{-13} M, $n=4$; 10^{-12} M, $n=5$; 10^{-11} M, $n=7$; 10^{-10} M, $n=10$; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, $n=8$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=4$; 10^{-11} M bis 10^{-8} M, $n=8$; 10^{-7} M, $n=6$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.2.1.5 Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$

Das Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ wurde durch 10^{-9} M Progesteron bei **OASFs** signifikant reduziert (Median bei 96%, $p<0,05$). In der Gruppe der **RASFs** ließ sich bei Konzentrationen von 10^{-10} M und 10^{-9} M eine signifikante Reduktion der Integrinexpression (Median von 93% bzw. 97%, $p<0,05$) beobachten (Abb. 3.13).

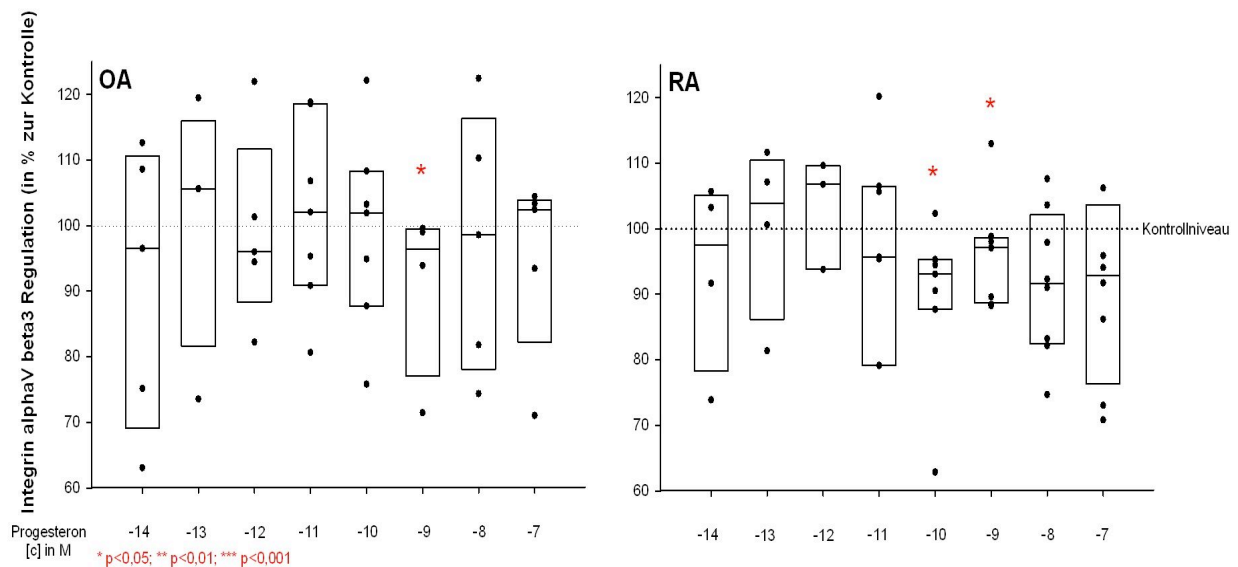


Abb. 3.13: Regulation des Integrins $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ unter Progesteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-14} M, $n=5$; 10^{-13} M, $n=4$; 10^{-12} M, $n=5$; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=7$; 10^{-9} M, $n=4$; 10^{-8} M bis 10^{-7} M, $n=5$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-14} M bis 10^{-13} M, $n=4$; 10^{-12} M, $n=3$; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=7$; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, $n=8$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau;

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

3.2.1.6 Integrin beta1

Bei Betrachtung der Wirkung von Progesteron auf die Expression von Integrin $\beta 1$ konnte nur bei 10^{-12} M Progesteron ein inhibierender Effekt bei **OASFs** festgestellt werden (Median bei 86%, $p < 0,05$). Bei **RASFs** hatte Progesteron keinen Effekt auf die $\beta 1$ Integrinexpression (Abb. 3.14).

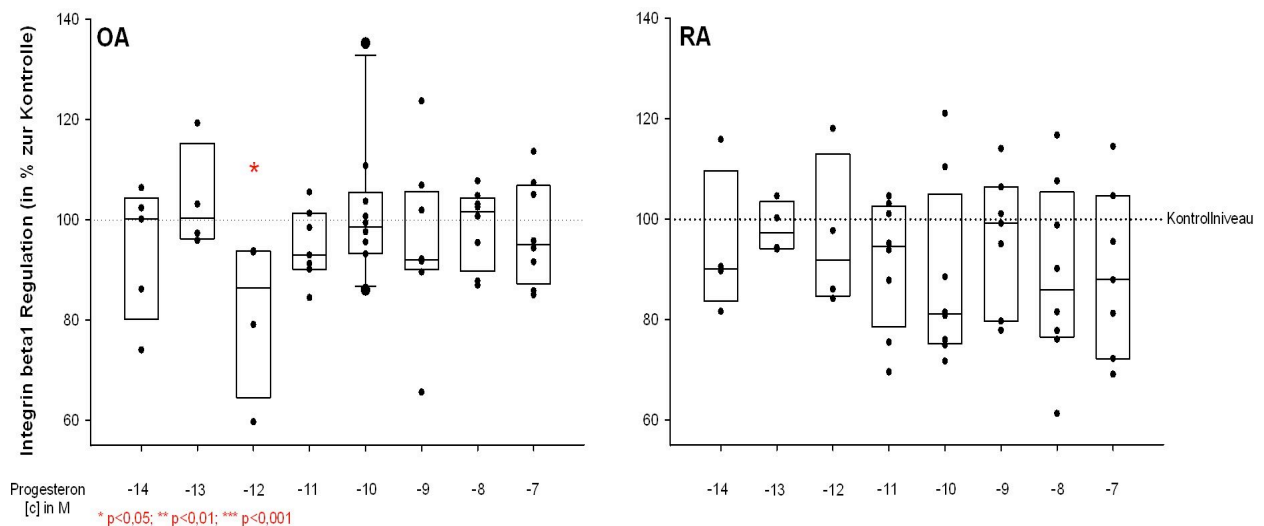


Abb. 3.14: Regulation des Integrins beta1 unter Progesteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): 10^{-14} M, n=5; 10^{-13} M bis 10^{-12} M, n=4; 10^{-11} M, n=7; 10^{-10} M, n=10; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, n=8; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): 10^{-14} M bis 10^{-12} M, n=4; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, n=8; 10^{-9} M, n=7; 10^{-8} M, n=8; 10^{-7} M, n=7; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.2.2 Untersuchung der IL-6 Produktion von OASF und RASF mittels ELISA nach Stimulation mit Progesteron

In der Gruppe der **OASFs** beeinflusste Progesteron die IL-6 Sekretion nur in der niedrigsten Konzentration von 10^{-11} M. Hier konnte eine Erhöhung der IL-6 Produktion auf 117% im Median beobachtet werden ($p<0,05$). In der Konzentration 10^{-10} M konnte man eine Tendenz zur Steigerung (Median bei 105%, $p=0,065$) erkennen.

Bei 10^{-11} M fand sich auch bei den **RASFs** ein Anstieg der IL-6 Produktion (nicht-signifikant). Bei 10^{-10} M wurde die IL-6 Produktion reduziert (Median bei 87%, $p<0,05$) (Abb. 3.15).

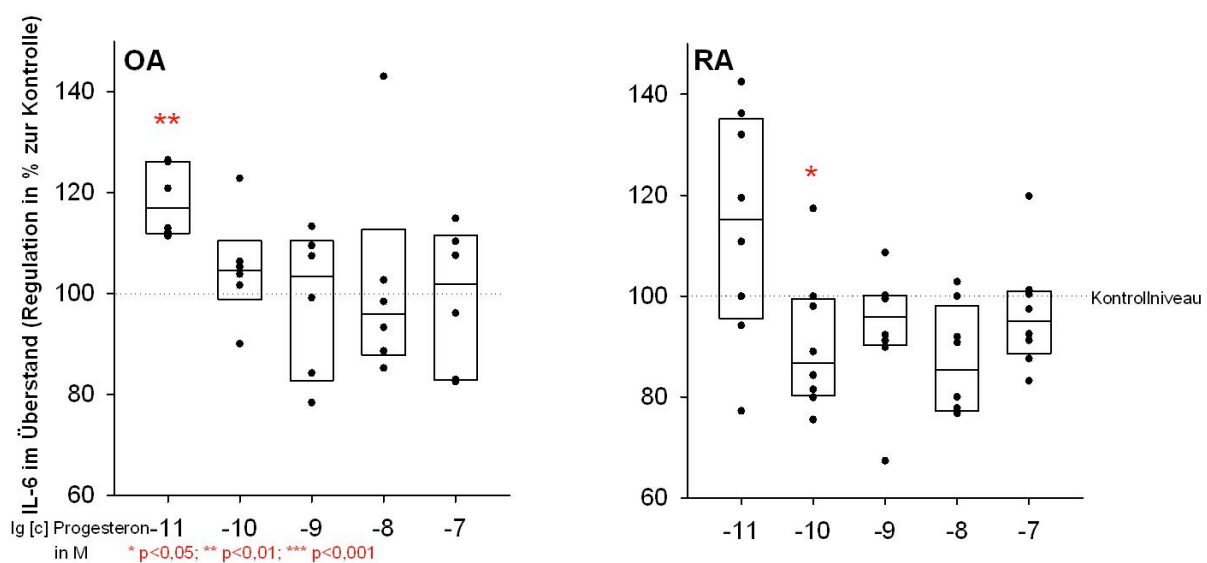


Abb. 3.15: Interleukin-6 im Überstand unter Progesteron

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): n=6; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): n=8; Kontrollniveau: IL-6 Ausschüttung der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

3.2.3 Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion

Im Gegensatz zu DHT (siehe 3.1.3) zeigte sich bei Stimulation mit Progesteron keine signifikante Korrelation zwischen der IL-6 Produktion und der Expression an Integrin $\beta 1$ auf der Zelloberfläche von **OASFs** und **RASFs** (Abb. 3.16).

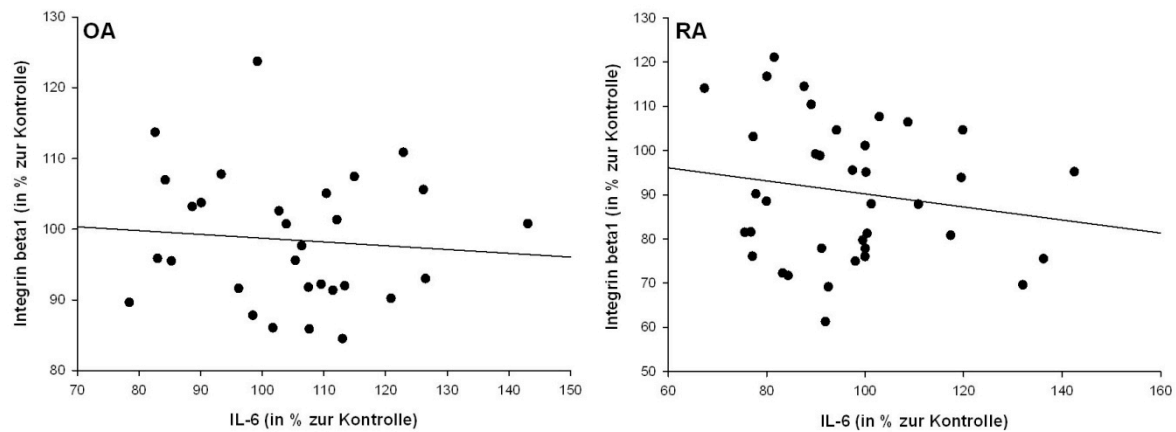


Abb. 3.16: Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion

Korrelation der Daten der beta1 Integrinexpression nach Stimulation mit Progesteron in den Konzentrationen 10^{-11} M bis 10^{-7} M mit denen der IL-6 Produktion mittels Spearman Korrelation.

3.3 17 β -Estradiol und ICI 182, 780

3.3.1 FACS-Analyse des Einflusses von 17 β -Estradiol, 17 β -Estradiol in Kombination mit ICI 182, 780 und ICI 182, 780 auf die Integrinexpression synovialer Fibroblasten von OA und RA Patienten im Vergleich

3.3.1.1 Integrin alpha1

Während 17 β -Estradiol alleine keinen Einfluss auf die Expression des Integrins $\alpha 1$ bei **OASFs** ausübte, konnte unter zusätzlicher Gabe von ICI 182, 780 (1 μ M) eine verstärkte Integrin $\alpha 1$ Expression bei 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M Estradiol beobachtet werden (Medianwerte bei 110%, 109% und 105%, $p < 0,05$).

Bei alleinigem Einsatz von ICI 182, 780 (nicht abgebildet) in den Konzentrationen 10^{-8} bis 10^{-6} M zeigten sich keine signifikanten Effekte.

Im Gegensatz dazu bewirkte 17 β -Estradiol alleine bei **RASFs** eine vermehrte Expression von Integrin $\alpha 1$. Wirksam waren dabei die Konzentrationen 10^{-11} M und 10^{-10} M (Medianwerte bei 109% und 110%, $p < 0,05$).

Eine Tendenz zur Signifikanz zeichnete sich in der Konzentration 10^{-8} M ab (Median bei 113%, $p = 0,065$). Der gemeinsame Einsatz von 17 β -Estradiol und ICI 182, 780 hatte im Gegensatz zu OASFs keine signifikanten Effekte.

Unter alleiniger Stimulation von RASFs durch ICI 182, 780 (nicht abgebildet) konnte man bei 10^{-7} M eine Verstärkung der Expression von Integrin $\alpha 1$ auf 113% beobachten ($p < 0,05$) (Abb. 3.17).

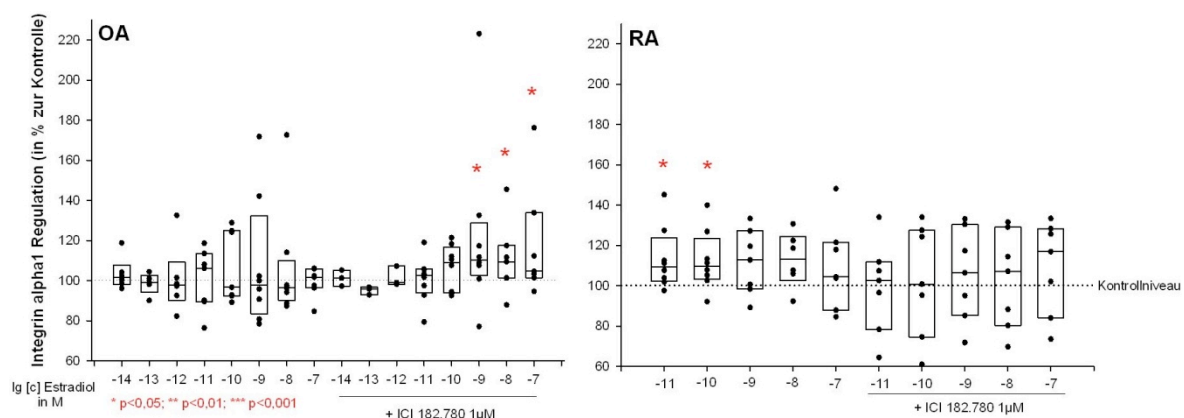


Abb. 3.17: Regulation des Integrins alpha1 unter Estradiol und ICI

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): Estradiol: 10^{-14} M, $n=6$; 10^{-13} M, $n=5$; 10^{-12} M, $n=6$; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=7$; 10^{-9} M bis 10^{-8} M, $n=8$; 10^{-7} M, $n=7$; Estradiol + ICI: 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=3$; 10^{-11} M bis 10^{-9} M, $n=8$; 10^{-8} M bis 10^{-7} M, $n=7$; untersuchte Patienten mit Rheumatoide Arthritis (RA): Estradiol: 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=8$; 10^{-9} M, $n=7$; 10^{-8} M, $n=6$; 10^{-7} M, $n=7$; Estradiol + ICI: 10^{-11} M bis 10^{-7} M, $n=7$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.3.1.2 Integrin alpha3

Die in Abb. 3.18 dargestellte Veränderung des Integrins $\alpha 3$ lässt in der Gruppe der **OASFs** signifikante Mehrexpressionen bei 10^{-13} , 10^{-12} und 10^{-10} M erkennen ($p < 0,05$). Das Maximum lag hier bei einer Konzentration von 10^{-12} M (Median bei 132%). Bei gleichzeitiger Gabe von Estradiol in verschiedenen Konzentrationen und ICI 182, 780 ($1 \mu\text{M}$), fand sich bei 10^{-9} M 17β -Estradiol ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Integrinexpression (Median: 110%), bei 10^{-11} M war diese hoch signifikant (Median: 107%, $p < 0,001$). Bei Inkubation mit ICI 182, 780 alleine (nicht abgebildet) lagen alle Messwerte über Kontrollniveau, in der Konzentration von 10^{-8} M war dies signifikant (Median bei 109%, $p < 0,05$).

Betrachtet man den Effekt von 17β -Estradiol auf **RASFs**, so fand man eine signifikante Erhöhung des Integrins $\alpha 3$ bei Estradiolkonzentrationen von 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M ($p < 0,05$). Das Maximum wurde bei 10^{-7} M mit einem Median von 123% erreicht. Die Inhibition der klassischen Östrogenrezeptoren mit ICI 182, 780 erbrachte keinen attenuierenden Einfluss auf die Integrinexpression. 17β -Estradiol zeigte in den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-8} M zusammen mit ICI 182, 780 ($1 \mu\text{M}$) eine signifikante Erhöhung der $\alpha 3$ Integrinexpression ($p < 0,05$) mit einem maximalen Median von 127% bei 10^{-9} M Estradiol. Setzte man ICI 182, 780 alleine (nicht abgebildet) zur Stimulation ein, ergab sich bei 10^{-7} M ein signifikanter Anstieg von Integrin $\alpha 3$ relativ zur Kontrolle (Median bei 116%; $p < 0,05$), während die Gabe von 10^{-6} M eine signifikante Reduktion auf einen Median von 83% mit sich brachte ($p < 0,05$) (Abb. 3.18).

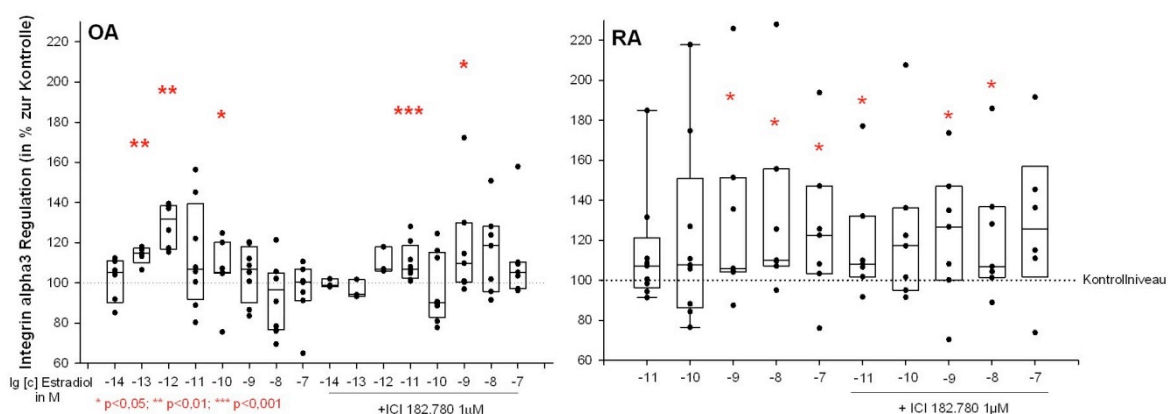


Abb. 3.18: Regulation des Integrins alpha3 unter Estradiol und ICI

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): Estradiol: 10^{-14} M, n=6; 10^{-13} M, n=5; 10^{-12} M, n=6; 10^{-11} M, n=8; 10^{-10} M, n=7; 10^{-9} M bis 10^{-8} M, n=8; 10^{-7} M, n=7; Estradiol + ICI: 10^{-14} M bis 10^{-12} M, n=3; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, n=8; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, n=7; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): Estradiol: 10^{-11} M bis 10^{-10} M, n=9; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, n=7; Estradiol + ICI: 10^{-11} M bis 10^{-8} M, n=7; 10^{-7} M, n=6; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.3.1.3 Integrin alpha5

Die Expression von Integrin $\alpha 5$ wurde in **OASFs** nicht durch Estradiol beeinflusst, lediglich 10^{-7} M 17β -Estradiol in Kombination mit $1 \mu\text{M}$ ICI 182, 780 führte zu einem Anstieg der Integrin $\alpha 5$ Expression (Median bei 106%, $p < 0,05$). ICI 182, 780 alleine (nicht abgebildet) erhöhte in den Konzentrationen 10^{-8} M bis 10^{-6} M die gemessene $\alpha 5$ Integrinexpression, bei 10^{-7} M war dies signifikant (Median bei 105%, $p < 0,05$).

Dagegen zeigte der Einsatz von 17β -Estradiol in der Gruppe der **RASFs** in den Konzentrationen 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$). Bei zusätzlicher Gabe von ICI 182, 780 ($1 \mu\text{M}$) bewirkte nur 10^{-7} M Estradiol eine signifikante Mehrexpression (Median bei 111%, $p < 0,05$) (Abb. 3.19).

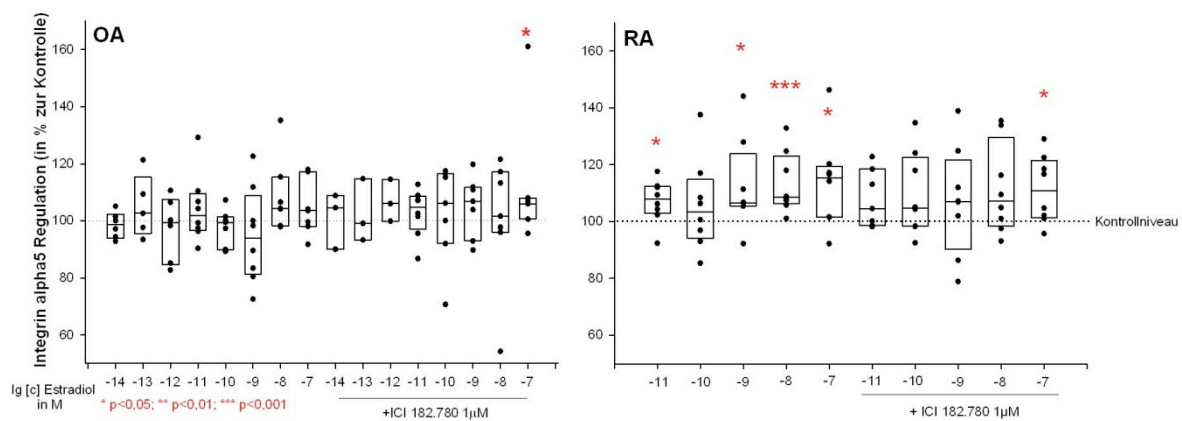


Abb. 3.19: Regulation des Integrins alpha5 unter Estradiol und ICI

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): Estradiol: 10^{-14} M, $n=6$; 10^{-13} M, $n=5$; 10^{-12} M, $n=6$; 10^{-11} M, $n=8$; 10^{-10} M, $n=7$; 10^{-9} M, $n=8$; 10^{-8} M bis 10^{-7} M, $n=7$; Estradiol + ICI: 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=3$; 10^{-11} M, $n=8$; 10^{-10} M bis 10^{-7} M, $n=7$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): Estradiol: 10^{-11} M bis 10^{-7} M, $n=8$; Estradiol + ICI: 10^{-11} M, $n=7$; 10^{-10} M bis 10^{-7} M, $n=8$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.3.1.4 Integrin α_v

In **OASFs** wurde Integrin α_v nur durch 10^{-7} M 17β -Estradiol signifikant reduziert (Median bei 93%, $p<0,05$). Kombinierte man Estradiol mit ICI 182, 780, ließen sich keine signifikanten Ergebnisse beobachten. Der alleinige Einsatz von ICI 182, 780 (nicht abgebildet) führte bei der Konzentration 10^{-7} M zu einem signifikanten Anstieg der α_v Integrinexpression auf einen Median von 106% ($p<0,05$).

Die Stimulation der **RASFs** mit 10^{-8} M Estradiol führte zu einem Anstieg von α_v (Median bei 116%, $p<0,05$). Andere Dosierungen sowie die Kombination mit ICI 182, 780 zeigten keine signifikanten Effekte (Abb. 3.20).

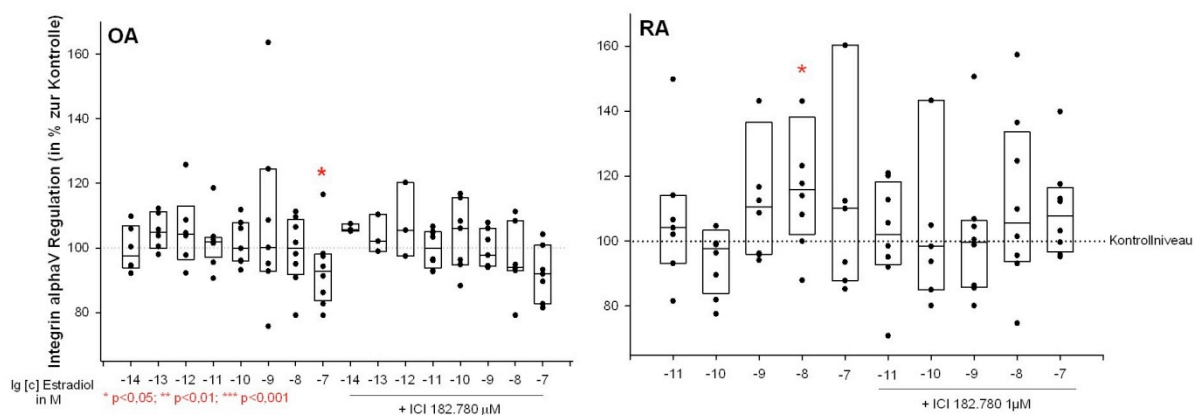


Abb. 3.20: Regulation des Integrins α_v unter Estradiol und ICI

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): Estradiol: 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=6$; 10^{-11} M, $n=8$; 10^{-10} M bis 10^{-9} M, $n=7$; 10^{-8} M bis 10^{-7} M, $n=8$; Estradiol + ICI: 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=3$; 10^{-11} M, $n=8$; 10^{-10} M bis 10^{-7} M, $n=7$; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): Estradiol: 10^{-11} M, $n=7$; 10^{-10} M bis 10^{-8} M, $n=8$; 10^{-7} M, $n=7$; Estradiol + ICI: 10^{-11} M, $n=8$; 10^{-10} M, $n=7$; 10^{-9} M bis 10^{-7} M, $n=8$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau;

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

3.3.1.5 Integrin alphavbeta3

Das Heterodimer $\alpha\text{v}\beta 3$ konnte bei **OASFs** lediglich in der Konzentration 10^{-14} M signifikant moduliert werden (Median bei 106%, $p < 0,05$). Bei gleichzeitiger Verwendung von ICI 182, 780 ($1 \mu\text{M}$) und 10^{-10} M 17β -Estradiol zeigte sich eine signifikante Erhöhung von $\alpha\text{v}\beta 3$ (Median von 104%; $p < 0,05$). Bei alleiniger Verwendung von ICI 182, 780 (nicht abgebildet) konnte man bei 10^{-7} M eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Verstärkung der Integrinexpression mit einem Median von 114% erkennen. **RASFs** zeigten unter Estradiol alleine keine Modulation der Integrinexpression. Gleichzeitige Stimulation von ICI 182, 780 ($1 \mu\text{M}$) und Estradiol bewirkte jedoch einen Anstieg. Dabei zeigten sich signifikante Ergebnisse bei den Estradiolkonzentrationen 10^{-9} M und 10^{-7} M (Median bei 108% und 110%, $p < 0,05$). Der alleinige Einsatz von ICI 182, 780 (nicht abgebildet) lieferte ebenfalls eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der Integrinexpression, und zwar bei 10^{-8} M auf 103% und bei 10^{-7} M auf 112% (Abb. 3.21).

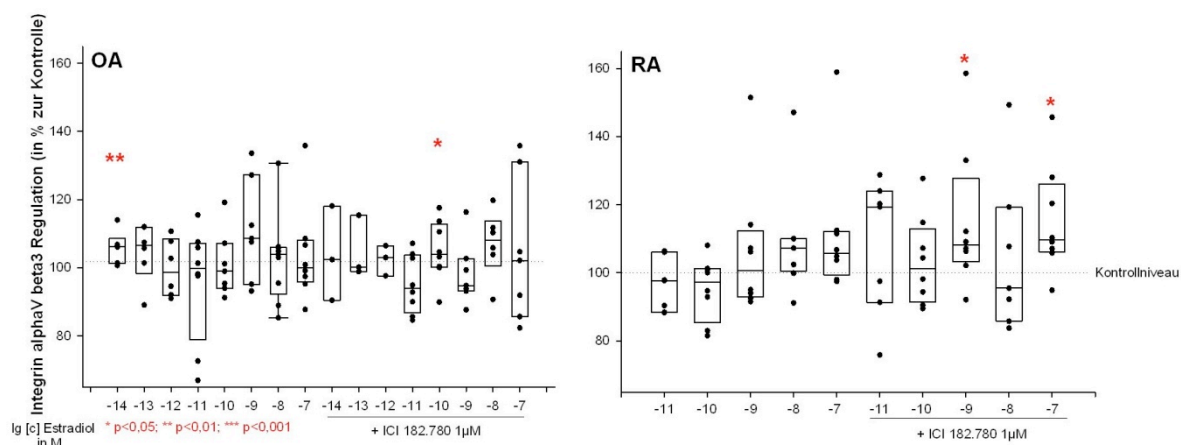


Abb. 3.21: Regulation des Integrins alphavbeta3 unter Estradiol und ICI

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): Estradiol: 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=6$; 10^{-11} M, $n=8$; 10^{-10} M bis 10^{-9} M, $n=7$; 10^{-8} M, $n=9$; 10^{-7} M, $n=8$; Estradiol + ICI: 10^{-14} M bis 10^{-12} M, $n=3$; 10^{-11} M bis 10^{-10} M, $n=8$; 10^{-9} M, $n=7$; 10^{-8} M, $n=6$; 10^{-7} M, $n=7$; untersuchte Patienten mit Rheumatoide Arthritis (RA): Estradiol: 10^{-11} M, $n=7$; 10^{-10} M bis 10^{-7} M, $n=8$; Estradiol + ICI: 10^{-11} M, $n=7$; 10^{-10} M bis 10^{-9} M, $n=8$; 10^{-8} M, $n=7$; 10^{-7} M, $n=8$; Kontrollniveau: Integrinexpression der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.3.2 Untersuchung der IL-6 Produktion von OASF und RASF mittels ELISA nach Stimulation mit 17 β -Estradiol

Bei Betrachtung der IL-6 Produktion fällt sowohl bei den **OASFs** als auch bei den **RASFs** eine statistisch signifikante Erhöhung der IL-6 Ausschüttung nach Stimulation mit Estradiol 10⁻¹¹ M auf. Bei OASFs lag der sich ergebende Median bei 129% (p<0,05), bei RASFs bei 113% (p<0,05). Mit zunehmender Estradiolkonzentration sank die IL-6 Produktion in beiden Gruppen beständig (Abb. 3.23).

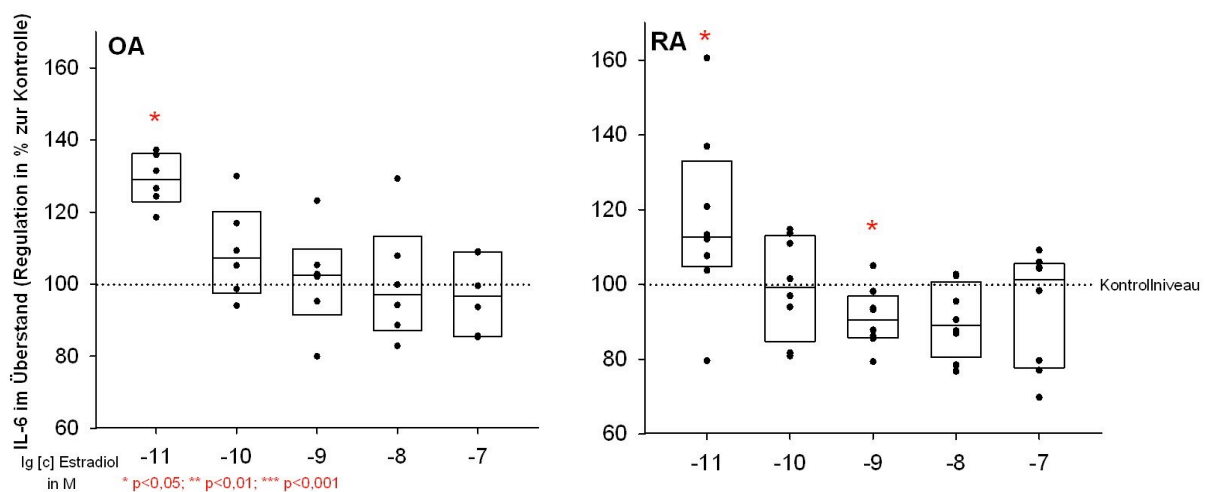


Abb. 3.23: Interleukin-6 im Überstand unter 17 β -Estradiol

Untersuchte Patienten mit Osteoarthritis (OA): n=6; untersuchte Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA): n=8; Kontrollniveau: IL-6 Ausschüttung der mit Ethanol stimulierten Fibroblasten als 100%-Bezugsniveau; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

3.3.3 Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion

In Abb. 3.24 ist die Menge an produziertem IL-6 in Beziehung zur Expression des Integrins $\beta 1$ unter Estradiolstimulation gesetzt (jeweils in Prozent zur Kontrolle).

Während sich bei **RASFs** keine signifikante Korrelation zwischen der $\beta 1$ Integrinexpression und produziertem IL-6 ergab, zeigten **OASFs** einen statistisch signifikanten, positiven Zusammenhang ($p=0,012$), d.h. ein Mehr an Integrin beta1 führte zu einem Plus an IL-6 und umgekehrt.

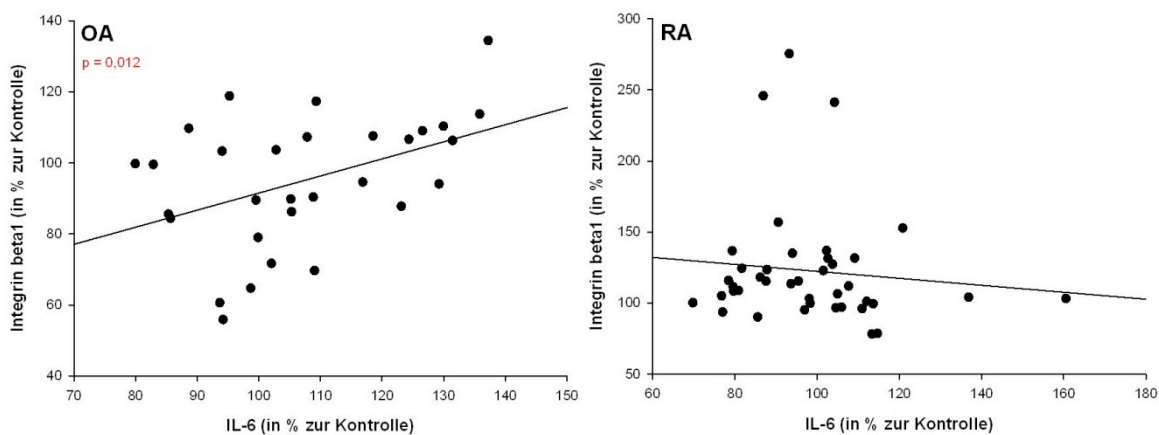


Abb. 3.24: Korrelation der beta1 Integrinexpression mit der IL-6 Produktion

Korrelation der Daten der beta1 Integrinexpression nach Stimulation mit 17β -Estradiol in den Konzentrationen 10^{-11} M bis 10^{-7} M mit denen der IL-6 Produktion mittels Spearman Korrelation.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss verschiedener Sexualhormone auf die Integrinexpression und Interleukin-6 Produktion synovialer Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis im Vergleich untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass DHT, Progesteron und Estradiol in bestimmten Konzentrationen die Expression einiger Oberflächenintegrine modulieren sowie die IL-6 Produktion verändern. Dabei ist es gelungen, einen direkten Zusammenhang zwischen der Zytokinproduktion und der Integrinexpression nachzuweisen.

Es überrascht nicht, dass die Resultate der Experimente bei OASFs und RASFs zum Teil recht ähnlich ausfielen. Wie im Abschnitt 1.3.3 bereits erläutert wurde, wird die traditionelle Sichtweise zur OA als einer nicht-entzündlichen, nur auf den Knorpel begrenzten Erkrankung mehr und mehr verlassen und ihr ebenso wie der RA eine inflammatorische Komponente zugesprochen.

Die Gemeinsamkeiten zwischen der OA und der RA werden auch deutlich, wenn man die Verstoffwechselung im Synovium vorhandener Sexualhormone untersucht.

Eine 2005 veröffentlichte Studie offenbarte erstmals drei wichtige Aspekte der Hormonkonversion bei Patienten mit fortgeschrittener RA und OA.⁸¹ Es konnte bei RA und OA in ähnlichem Maße gezeigt werden, dass der Einsatz von Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf Kosten von Testosteron sehr viele Östrogene und 16 α -hydroxylierte Produkte hervorbringt. Diesen wird eine mitogene und proliferationsfördernde Wirkung nachgesagt.¹⁵⁰⁻¹⁵² Sowohl bei RA- als auch bei OA-Patienten war die Rate an spontan ausgeschüttetem Östrogen im Vergleich zu freiem Testosteron deutlich erhöht und auch die Dichte von Aromatase-positiven Zellen, welche einerseits die Umsetzung von Testosteron zu Estradiol und andererseits von Androstendion zu Estron katalysieren, war in beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau. Insbesondere bei den RA-Patienten führte die Konversion von Androstendion (ASD) und Testosteron zu einer Blockade des Aromatisierungsprozesses mit hohen verfügbaren Spiegeln an antiinflammatorischen 5 α -hydroxylierten Androgenen. Die Therapie von RA-Patienten mag also vom Gebrauch nicht-aromatisierbarer Androgene – wie des in den vorliegenden Experimenten verwendeten 5 α -DHT – profitieren.¹⁵³ Die Ergebnisse oben erwähnter Studie zeigen aber auch, dass OA- und RA-Patienten im fortgeschrittenen Stadium an vergleichbaren chronisch-entzündlichen

Gelenkerkrankungen leiden, wenn auch das Entzündungsausmaß bei der RA ungleich höher ist.⁸¹ Eine vermehrte Hormonkonversion scheint nicht ausschließlich der RA vorbehalten, sondern es ist vielmehr so, dass die während der symptomatischen Phase einer entzündlichen Erkrankung zu beobachtenden Veränderungen nicht spezifisch für einen bestimmten inflammatorischen Prozess sind.¹⁵⁴ Eine Erklärung für die hohen Östrogenkonzentrationen vor allem in der Synovialflüssigkeit beider Geschlechter ergibt sich aus dem Umstand, dass inflammatorische Zytokine, z. B. TNF- α , IL-6 und IL-1, die bei der rheumatoiden Synovitis vermehrt vorhanden sind, die Aromataseaktivität in der Peripherie stimulieren. Dieses proinflammatorische Milieu führt darüber hinaus zu einer erhöhten Expression vieler Integrin-Untereinheiten. So belegen zahlreiche ältere Studien eine Vermehrung verschiedener Integrinrezeptoren bei chronischer Synovitis.^{155,156} Dabei ist jedoch bislang der Einfluss von Steroidhormonen auf die Integrinexpression nicht untersucht worden.

DHT modulierte in den durchgeführten Versuchen die Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 5$, αv und $\beta 1$. Die wirksamen Konzentrationen lagen dabei zwischen 10^{-8} M und 10^{-10} M. Während DHT bei OA die Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 5$ erhöhte, wurde bei RA nur $\alpha 1$ erhöht exprimiert, wohingegen $\alpha 5$ und αv reduziert wurden. Die signaltransduzierende Untereinheit $\beta 1$ wurde bei OA und RA reduziert.

Bei RA deutet die Reduktion von $\alpha 5$ und αv sowie eine vermehrte Expression an $\alpha 1$ auf einen Shift zu $\alpha 1\beta 1$ Heterodimeren hin. Die Hochregulation von $\alpha 1$ durch das Steroidhormon 17 α -DHT deckt sich mit Beobachtungen von Lowin et al., die eine Hochregulation dieses Adhäsionsrezeptors auf SFs nach Behandlung der Zellen mit dem entzündungshemmenden Steroidwirkstoff Cortisol beobachteten.¹⁵⁷ Auch in den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich nach Stimulation mit DHT, einem antiinflammatorisch wirksamen Hormon, signifikante Erhöhungen von $\alpha 1$ sowohl auf OASFs als auch RASFs. Dabei geht eine Erhöhung des Kollagenrezeptors $\alpha 1$ vermutlich mit einer verstärkten Adhäsion an Kollagen einher, was zu einer Hemmung von Migration und Invasion führen kann und damit eine Ausbreitung des Entzündungsgeschehens verhindert. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch beim Kollagenrezeptor $\alpha 2\beta 1$ im Zusammenhang mit Brustkrebserkrankungen angestellt werden. Hier wurde mittels de novo Expression dieses Integrins eine Abnahme der Tumorigenität durch Reduktion der Tumorzell dissemination erreicht.¹⁵⁸

Während die Untereinheit $\alpha 3$ unbeeinflusst von DHT blieb, zeigten Untersuchungen zum Integrin $\alpha 5$ eine signifikante Reduktion auf einen Median von 90% bei 10^{-9} M DHT in der Gruppe der RA. Lowin et al. fanden in ihren Untersuchungen zur Integrindichte im Bereich der Invasionszone in den Knorpel bei RA eine deutliche Steigerung von $\alpha 5$, αv und $\beta 1$ im Vergleich zur Subsynovialis.¹⁵⁷ Das lässt darauf schließen, dass eine erhöhte Expression des Integrins $\alpha 5$ eine stärkere Invasionsbereitschaft der entsprechenden Zelle mit sich bringt. Bei $\alpha 5\beta 1$ handelt es sich um den klassischen Fibronectinrezeptor, der nur dieses extrazelluläre Matrixprotein bindet. Die Fibronectinspiegel sind bei Patienten mit OA in Knorpel und Synovialflüssigkeit erhöht, bei RA-Patienten findet sich die stärkste Ausprägung im Bereich von Synovialis und Pannusbildung.¹⁵⁹ Die Adhäsion an Fibronectin schützt Synovialzellen vor der Fas-induzierten Apoptose, wodurch der Entzündungsprozess bei der RA aufrechterhalten werden kann.¹⁶⁰ Eine im Rahmen vorliegender Untersuchungen erbrachte signifikante Reduktion auf einen Median von 90% in der DHT-Konzentration 10^{-9} M kann also einen Hinweis auf die antiinflammatorische Wirkung von DHT darstellen.

Neben seiner Bedeutung für das Überleben und die Proliferation von Zellen reguliert $\alpha 5\beta 1$ auch die Zytokin- und Wachstumsfaktorproduktion. Beispielsweise steigt nach Bindung von $\alpha 5\beta 1$ die Synthese von B-Lymphozyten-aktivierendem-Faktor (BAFF).¹⁶¹ Dies bringt nicht nur die Synthese von B-Lymphozyten und den Immunglobulin-Klassenwechsel in Gang, sondern führt vermutlich auch über einen autokrinen Mechanismus zur Stimulation der NF- κ B-Aktivität der SFs. NF- κ B-kontrollierte Gene wie IL-8, Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor (HB-EGF) oder Endothelin-1 kontrollieren Angiogenese und Entzündung, so dass deren vermehrte Ausschüttung eine RA aggravierern.

Auch scheint DHT mit dem NF- κ B-Komplex zu interferieren, wobei hieraus jedoch eine reduzierte Makrophagenproliferation und ein proapoptotisches Milieu resultiert.⁸⁶ Eine – wie sich in vorliegenden Untersuchungen in der Gruppe der RASFs ergebende – Reduktion der $\alpha 5\beta 1$ -Expression durch DHT mit folglich geringer Aktivierung von NF- κ B würde demnach diesen Wirkmechanismus von DHT unterstützen.

Die $\alpha 5\beta 1$ -vermittelte Adhäsion an Fibronectin kann auch die Synthese von IL-1 β regulieren.¹⁶² Daraus kann man die Vermutung ableiten, dass DHT in genügend hoher Konzentration über eine Reduktion von $\alpha 5\beta 1$ möglicherweise die proinflammatorische

Wirkung von zugegebenem IL-1 β antagonisiert. Dies zeigte sich auch in vorliegenden Untersuchungen mit einem hochsignifikanten Ergebnis bei der DHT-Konzentration 10⁻⁸ M.

Auch das Integrin α_v wurde durch DHT signifikant reduziert. Heterodimere, die α_v beinhalten, stellen eine weitere Gruppe an Fibronectin-bindenden Integrinen dar. Ein Polymorphismus in dem für das Integrin α_v kodierenden Gen ist mit der Entwicklung einer RA innerhalb der europäisch-kaukasischen Bevölkerung assoziiert.¹⁶³ Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet Fibronectin mit einer hohen Affinität und gestaltet zusammen mit $\alpha_5\beta_1$ die Fibronectinmatrix.¹⁶⁴ Daneben geht $\alpha_v\beta_3$ im Gegensatz zu $\alpha_5\beta_1$ auch mit anderen extrazellulären Matrixproteinen wie Vitronectin, Osteopontin und Bone Sialoprotein eine Verbindung ein. Zu finden ist dieses Integrin-Heterodimer u. a. auf SFs, Endothelzellen und Osteoklasten.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Diese Zelltypen lassen schon die Beteiligung von $\alpha_v\beta_3$ an Knochenresorption, Neovaskularisierung und Inflammation, den Hauptmerkmalen von Erkrankungen wie der RA und anderen Arthropathien, erkennen.^{168,169} Eine Reduktion des Integrins α_v in der Gruppe der RASFs unterstreicht also ebenfalls die antiinflammatorische Wirkung von DHT.

Besonders beachtlich war die hochsignifikante Reduktion von Integrin β_1 bis zu einem Median von 79% im Vergleich zur Kontrolle unter Stimulation der RASFs mit DHT. Rinaldi et al. konnten zeigen, dass die Expression von β_1 -Integrinen mit der Bindung von RASFs an die extrazelluläre Matrix korreliert und dass Antikörper gegen β_1 -Integrine die Bindung an den Knorpel zumindest teilweise behindern. Dabei ist die Hemmung der Knorpelbindung durch Anti- β_1 -Integrin-Antikörper bei RASFs signifikant höher als bei normalen Zellen.^{30,170} Außerdem fanden sie bei länger kultivierten RASFs eine signifikant höhere Expression von β_1 -Integrinen sowie andere Untergruppen von α -Integrin-Rezeptorketten als bei normalen SFs. Auch die über Integrine vermittelte Interaktion der Fibroblasten mit Liganden der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ IV, Fibronectin, Laminin und Tenascin war signifikant erhöht.^{155,170} Die Aktivierung von β_1 -Integrinen führt zudem zu einer Induktion von MMPs. In diesem Zusammenhang konnten Wang et al. nachweisen, dass die Invasivität von SFs durch Antikörper gegen β_1 -Integrine gehemmt werden kann.¹⁷¹ Eine Reduktion von Integrin β_1 geht also mit einer verminderten Migration der SFs einher und bringt folglich eine Besserung der Entzündungsreaktion mit sich. In der Gruppe der OASFs war das Ausmaß der Reduktion etwas geringer. Dies könnte durch eine Beobachtung von Nakayamada et al. zu erklären

sein. Diese Gruppe verglich die Expression von $\beta 1$ sowie die damit verbundene Signalaktivierung bei OASFs mit RASFs und stellte fest, dass trotz ähnlicher Expression bei den OASFs keine Induktion des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) erfolgte.¹⁷² ICAM-1 kann auch durch IL-1 und TNF- α induziert werden und findet sich auf Gefäßendothelien, Makrophagen und Lymphozyten. Es ist von Bedeutung für die Stabilisierung von Zell-Zell-Interaktionen und erleichtert den Leukozyten die Einwanderung ins Entzündungsgebiet.¹⁷³ Gerade in der Gruppe der RASFs scheint also Integrin $\beta 1$ eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Milieus zu haben. Folglich macht eine stärkere Reduktion in dieser Gruppe durch das antiinflammatorische DHT Sinn. Kombinierte man aber die Gabe von DHT mit IL-1 β , so zeigte sich bei beiden Zelltypen eine signifikante Erhöhung der Integrinexpression. Die Umwandlung von SFs in einen invasiveren Phänotyp wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren wie TNF und IL-1 β angestoßen.¹⁷⁴ Gemäß in vitro Untersuchungen stimulieren diese die Expression verschiedener Integrinuntereinheiten, so auch die von $\beta 1$.^{175,176} Offenbar gelang es DHT in diesem Fall nicht die entzündungsfördernde Wirkung von IL-1 β zu antagonisieren. Über seine Wirkung auf das Integrin $\beta 1$ beeinflusst DHT auch die Produktion des Zytokins IL-6. SFs sind in der Lage große Mengen an IL-6 und IL-8 zu produzieren.¹⁷⁷ Wie schon in der Einleitung beschrieben ist IL-6 das am zahlreichsten vorkommende Zytokin im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten. Außerdem besteht eine klare Korrelation zwischen der Menge an gemessenem IL-6 und der Krankheitsaktivität sowie dem Grad der Gelenkzerstörung. Mit seinen lokalen und systemischen Auswirkungen kann es als zentrales Zytokin in der Pathogenese der RA betrachtet werden. Damit stellte sich die Frage, welche Auswirkungen eine Stimulation mit verschiedenen Sexualhormonen – neben der Beeinflussung der Integrinexpression – auf die IL-6 Produktion haben würde. Im Falle von DHT konnte man eine deutliche Suppression beobachten. So fand sich sowohl bei den OASFs als auch den RASFs eine zum Teil beachtliche, signifikante Hemmung im Vergleich zur Ethanolkontrolle mit Medianwerten von bis zu 80%. Dies unterstreicht wiederum klar die entzündungshemmende Wirkung von DHT. Korreliert man die gemessene IL-6 Menge noch mit der $\beta 1$ -Integrinexpression, so kann man für RASFs einen statistisch signifikanten positiven Zusammenhang feststellen und bei den OASFs stellt sich dieser mit Tendenz zur Signifikanz dar. Dies lässt sich damit erklären, dass die „Überstimulation“ von Zellen über Integrin-vermittelte

Signaltransduktionswege die basale Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 erhöht.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰

Wenn Integrine über ihre Liganden aktiviert werden, werden verschiedene Signalwege angestoßen. Beispielsweise werden die Focal Adhesion Kinase (FAK), der MAP-Kinase-Weg, die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert. Aber nicht nur Integrine, sondern auch Wachstumsfaktoren und Zytokine benutzen diese Signaltransduktionswege, was auf ein komplexes Zusammenspiel schließen lässt.⁴² Bei der Durchführung der Korrelation konzentrierten wir uns auf das Integrin $\beta 1$, da es sich hierbei um eine äußerst bedeutsame Untereinheit handelt, die zur Bindung von extrazellulären Matrixproteinen mit sehr vielen α -Untereinheiten heterodimerisieren kann. Spiegeländerungen dieses Integrins oder seiner Liganden sind ein wichtiger Faktor, welcher die Knorpeldestruktion bei der RA vorantreibt.⁴² Dass eine Verminderung an Integrin $\beta 1$ unter DHT-Stimulation mit einer Reduktion der IL-6 Produktion einherging und umgekehrt, unterstreicht deren wechselseitige Beziehung zueinander.

Progesteron beeinflusste in der Gruppe der RASFs die Menge keines der untersuchten Integrine signifikant mit Ausnahme von $\alpha \nu \beta 3$. Hier erreichte es in den Konzentrationen 10^{-9} und 10^{-10} M eine Reduktion der Integrinexpression. Über die spezifische Bedeutung von $\alpha \nu \beta 3$ auf SFs ist zwar zum aktuellen Zeitpunkt noch wenig bekannt, allerdings lassen gerade Studien aus der Tumorforschung erkennen, dass dieses Integrin die Gewebsinvasion vorantreibt.¹⁵⁷ Die Expression von Integrin $\alpha \nu \beta 3$ ist charakteristisch für einige invasive Tumorarten wie Glioblastome, Ovarial- und Mammakarzinome.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ Bei Melanomen fördert eine erhöhte Expression an $\alpha \nu \beta 3$ das vertikale Wachstum und die Lymphknotenmetastasierung und korreliert folglich mit einer schlechten Patientenprognose.¹⁸⁵⁻¹⁸⁸ Die Interaktion von $\alpha \nu \beta 3$ mit seinen Liganden scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung dieser hyperplastischen, tumorähnlichen, invasiven Synovitis, die zur Destruktion von Knorpel und Knochen bei der RA beiträgt, zu spielen. Die Hauptaufgabe von $\alpha \nu \beta 3$ besteht dabei in der Förderung der Neovaskularisierung. Endothelzellen im Synovium sind dem ständigen Einfluss von proangiogenen Stimuli wie TNF und VEGF ausgesetzt, was zur Expression von $\alpha \nu \beta 3$ auf sprossenden Endothelzellknospen und zur Entwicklung neuer Blutgefäße führt. $\alpha \nu \beta 3$ erleichtert dann diesen neu entstandenen Blutgefäßen die Anheftung an und die Migration durch

die extrazelluläre Matrix.¹⁸⁹ Integrin α_v und im Speziellen $\alpha_v\beta_3$ nimmt daher eine Schlüsselrolle im Angiogeneseprozess ein.

All diese Beobachtungen stützen somit die Annahme, dass die Blockade dieses Integrins eine Besserung der RA mit sich bringt. Die statistisch signifikante Reduktion der Expression von $\alpha_v\beta_3$ bei beiden untersuchten Arthropathien gerade auch in den physiologischen Progesteronkonzentrationen 10^{-10} M und 10^{-9} M lässt sich also sehr gut mit der diesem Hormon zugeschriebenen antiinflammatorischen Wirkung vereinbaren.

Straub et al. konnten bereits nachweisen, dass Progesteron neben seiner Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen auch die Produktion verschiedener Zytokine beeinflusst. Zusätzlich zur Inhibition von TNF und IL-1 β wird die Produktion von IL-6 unterdrückt.⁶⁹ Die Ergebnisse der Versuche mit RASFs bestätigten diese Suppression teilweise. In der physiologischen Konzentration 10^{-10} M konnte man beispielsweise eine signifikante Reduktion beobachten. Da ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Menge an gemessenem IL-6 und dem Ausmaß des Entzündungsgeschehens sowie der Gelenkzerstörung besteht, ist eine Reduktion der IL-6 Produktion in der Gruppe der RASFs ein weiterer Hinweis auf die antiinflammatorische Wirkung von Progesteron.

Der Einsatz von 17 β -Estradiol (in Kombination mit ICI 182, 780) führte bei allen untersuchten Integrinen zu einer Modulation der Expression.

Betrachtet man die Auswirkungen einer Stimulation mit 17 β -Estradiol auf die Integrinexpression SFs, so gilt es, sich stets des dichotomen Effekts dieses Hormons bewusst zu sein. So üben variierende Östrogenkonzentrationen unterschiedliche bzw. gegensätzliche Effekte auf Immunzellen aus.^{83,84} Während Östrogene in physiologischer Konzentration die Immunglobulinproduktion antreiben, kommt es in pharmakologisch hohen Konzentrationen zu einer verminderten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF.⁸⁵ Zurückzuführen ist dies auf die Inhibition von NF- κ B bei hohen Konzentrationen, die in etwa denen der Spätschwangerschaft entsprechen.¹¹⁰ Außerdem konnten einige in vitro Studien zeigen, dass Östrogene in hohen Konzentrationen die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin oder VCAM-1 unterdrücken, während bei niedrigen Konzentrationen das Gegenteil der Fall zu sein scheint.⁸³

Dieser dosisabhängige Effekt von Östrogenen zeigte sich auch bei der Untersuchung der Expression des Integrins α_1 in der Gruppe der OASFs. Unter Kombination von

17 β -Estradiol und ICI 182, 780 war bei 10⁻⁹ M zunächst eine signifikante Erhöhung auf einen Median von 110% zu verzeichnen. Mit zunehmender Steigerung der Estradiolkonzentration kam es dann zu einem stetigen signifikanten Abfall der Integrinexpression. α 1 ist als wichtiges Kollagen-bindendes Integrin antiapoptotisch wirksam und fördert die Zellmigration und Umstrukturierung der Kollagenmatrix. Des Weiteren wird die Expression von α 1 im Bereich der Synovialmembran durch das proinflammatorische Milieu einer RA begünstigt. Dies deckt sich auch mit den von mir gemachten Beobachtungen. So zeigte sich bei RASFs in sämtlichen eingesetzten Estradiolkonzentrationen eine Hochregulation des Integrins α 1. Bei gemeinsamem Einsatz von Estradiol und ICI 182, 780 fand sich ein ähnliches Ergebnis. Dem selektiven Östrogenrezeptormodulator ICI 182, 780, der – wie unten stehender Abbildung zu entnehmen ist – an den klassischen Östrogenrezeptoren als Antagonist und am G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR30 als Agonist wirkt, gelang es also scheinbar nicht den Effekt von Estradiol zu antagonisieren. Vielmehr fand sich sogar bei alleiniger Verwendung von ICI 182, 780 zur Stimulation bei 10⁻⁷ M eine signifikante Verstärkung der Integrinexpression auf 113%. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass an der Promotion der Bildung von Integrin α 1 der membrangebundene Rezeptor GPR30 beteiligt ist (Abb. 4.1).

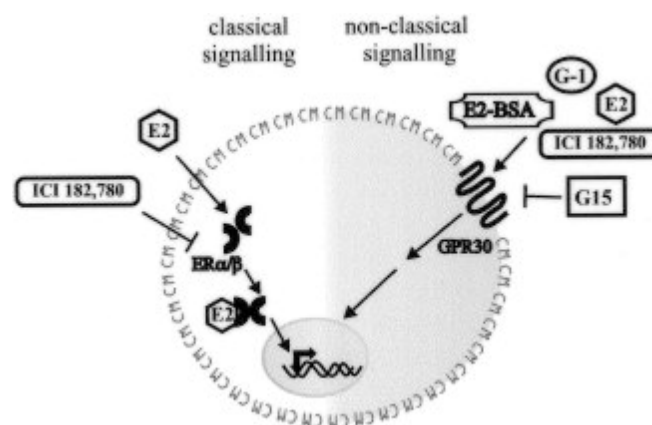


Abb. 4.1: Verschiedene Östrogenrezeptoren und deren Aktivierung

Die klassischen Östrogenrezeptoren ER α und ER β werden durch 17 β -Estradiol (E2) aktiviert und durch ICI 182, 780 inhibiert. Im Gegensatz dazu wirkt ICI 182, 780 am membrangebundenen Rezeptor GPR30 als Agonist, ebenso wie E2, G-1 und E2-BSA, ein an Albumin gekoppeltes Estradiol, das die Zellmembran nicht passieren kann.

Quelle: Jenei-Lanzl, Z., et al. Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling. *Arthritis Rheum* 62, 1088-1096 (2010).

Eine kontinuierliche Mehrexpression des Integrins $\alpha 3$ auf der Oberfläche von RASFs nach Stimulation mit 17β -Estradiol alleine und in Kombination mit ICI muss als proinflammatorisches Signal aufgefasst werden.

Das Integrin $\alpha 3\beta 1$ bindet Laminin, eine wichtige Komponente der Basalmembran, die in der Regel von Epithelzellen, Endothel und Fibroblasten gebildet wird. Im Rahmen einer RA wird zum einen die Anzahl der Lamininrezeptoren auf den SFs hochreguliert, zum anderen erhöht sich aber auch die Lamininproduktion und -sekretion, welches verstärkt an der Synovialmembran abgelagert wird.¹⁹⁰ Die Neoexpression von $\alpha 3\beta 1$ in der Synovialis von Patienten mit OA und RA steht dabei in Korrelation mit der Schwere der Synovialitis.^{155,162} Die Bindung von Integrin $\alpha 3\beta 1$ an Laminin führt zu einer vermehrten Ausschüttung von MMPs wie MMP-3 und MMP-10.¹⁹¹ Obwohl zum Zusammenhang zwischen Laminin und seinen Integrinrezeptoren mit dem Fortschreiten der RA nur wenig bekannt ist, deuten Ergebnisse aus der Tumorforschung darauf hin, dass die Hochregulation von $\alpha 3\beta 1$ Zellinvasion und Metastasierung vorantreibt.¹⁹²⁻¹⁹⁵ Diese Effekte könnten auch RASFs bei der Einwanderung in den Knorpel und dessen konsekutiver Zerstörung nutzen.

Auch in der Gruppe der OASFs ließen sich einige signifikante Erhöhungen der Integrinexpression beobachten. Die signifikanten Ergebnisse fanden sich hier allerdings v.a. im niedrigen Konzentrationsbereich. Stieg die eingesetzte Konzentration an 17β -Estradiol, ließ sich eher eine Tendenz zum Abfall der Integrinexpression erkennen. Dies lässt sich wieder mit der dosisabhängigen Wirkung von 17β -Estradiol erklären. Untersuchte man die Expression des Integrins $\alpha 5$ als Reaktion auf die Stimulation mit 17β -Estradiol, fanden sich bei den RASFs in den Konzentrationen 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-8} und 10^{-7} M signifikante Ergebnisse im Sinne einer Mehrexpression. Diese Resultate lassen sich sehr gut mit der proinflammatorischen Wirkung von 17β -Estradiol vereinbaren. Denn eine erhöhte Expression des Fibronektinrezeptors geht mit einer verstärkten Synthese dieses Glykoproteins in der Synovialis bei RA einher, so dass einer Erhöhung ein proinflammatorischer Effekt zugeschrieben werden kann.¹⁹⁶

Des Weiteren dient Fibronektin als chemotaktischer Faktor für Entzündungszellen, was einen zusätzlichen Beitrag zum proinflammatorischen Milieu darstellt.¹⁹⁷ Zeisel et al. gelang es, nach Stimulation synovialer Fibroblasten mit einem bakteriellen Liganden von $\alpha 5\beta 1$ einen Anstieg der MMP-3-Produktion zu beobachten, was ebenfalls darauf

hindeutet, dass eine erhöhte Integrinbindung die Gelenkzerstörung bei der RA vorantreibt.¹⁹⁸

Bei der Expression des Integrins α_v unter Stimulation mit 17β -Estradiol ließ sich wieder der konzentrationsabhängige Effekt dieses Hormons beobachten. Während bei 10^{-13} M in der Gruppe der OASFs noch eine Hochregulation zu sehen war, kam es in den nachfolgenden Konzentrationen zu einer schrittweisen Abnahme der Integrinexpression bis auf einen Median von 93% bei 10^{-7} M. Unsere Beobachtung deckt sich also damit, dass 17β -Estradiol in niedrigen Konzentrationen eher proinflammatorisch wirkt, bei hohen hingegen eher antiinflammatorisch. Dieser Umstand erklärt neben der Wirkung von Progesteron vermutlich auch eine Verbesserung der Krankheitssymptome im Zuge einer Schwangerschaft.¹⁰⁶

Ein ähnliches Ergebnis wie bei der Untersuchung der Expression von Integrin α_v konnte auch bei Betrachtung der β_1 -Regulation nach Stimulation mit 10^{-11} bzw. 10^{-7} M 17β -Estradiol auf der Oberfläche der OASFs festgestellt werden, was unsere Annahme der dosisabhängigen Wirkung noch unterstreicht. Gleichmaßen ließ sich bei den RA-Patienten in der Estradiolkonzentration 10^{-7} M ein beginnender Abfall der Integrinmenge erkennen, wohingegen ausgehend von der Konzentration 10^{-11} M bis zur Konzentration 10^{-8} M ein Anstieg der Integrinexpression zu verzeichnen war. Das Integrin β_1 ist die am meisten verbreitete Untereinheit, da sie auf Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten gefunden wird.^{42,156} Neben seiner Bedeutung für die Pathogenese der RA ist Integrin β_1 in diverse maligne Prozesse involviert. So fördert es die Metastasierungstendenz bei invasiven Mammakarzinomen und weist eine negative Korrelation mit der Gesamtüberlebensrate auf.¹⁹⁹ Eine Reduktion der Expression von Integrin β_1 in der pharmakologisch wirksamen Estradiolkonzentration 10^{-7} M könnte also mit einer verminderten Migration der SFs einhergehen und folglich eine Besserung der Entzündungsreaktion mit sich bringen.

Gleichmaßen ins Bild fügen sich die Messwerte der IL-6 Produktion nach Stimulation mit 17β -Estradiol. Analog zu der Studie von Straub et al. konnte bei OASFs und RASFs eine schrittweise Reduktion der IL-6 Ausschüttung, beginnend bei 10^{-11} M Estradiol, beobachtet werden. Demnach stimuliert Östrogen in physiologischen Konzentrationen die Immunglobulin- und Zytokinproduktion, während es in pharmakologisch hoher Konzentration die Bildung von IL-1, IL-6 und TNF inhibiert.⁸⁵ Zudem wurde beobachtet, dass Frauen nach der Menopause höhere Plasmaspiegel an

IL-6 aufweisen als während der Fertilitätsperiode.^{200,201} Unter Hormonersatztherapie kann man schließlich einen Abfall der Serumkonzentration dieses Zytokins detektieren, was der Wirkung von Östrogenen zugeschrieben wird.^{130,201,202} Die statistisch signifikante Korrelation von IL-6 Produktion und β 1-Integrinexpression in der Gruppe der OASFs, die auch bei den Ergebnissen der Stimulation mit DHT beobachtet wurde, lässt sich erneut aus der klaren Beziehung zwischen der IL-6 Produktion und der Entzündungsaktivität sowie dem Ausmaß der Gelenkzerstörung erklären. Daneben geht eine vermehrte β 1-Integrinexpression durch die Induktion von MMPs und die stärkere Bindung an die extrazelluläre Matrix mit einer ausgeprägteren Degradation des Gelenkknorpels einher. Des Weiteren erhöht die Stimulation von Zellen über Integrin-vermittelte Signaltransduktionswege die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Auch 17β -Estradiol beeinflusst also wie DHT die Zytokinproduktion über seine Wirkung auf das Integrin β 1.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Erstmals konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass Sexualhormone wie DHT, Progesteron und 17β -Estradiol einen Einfluss auf die Integrinexpression synovialer Fibroblasten aufweisen. Dieser hängt dabei eng von der verwendeten Hormonkonzentration ab. Aber nicht nur die Integrinexpression, sondern auch die Produktion von IL-6, einem zentralen Zytokin in der Pathogenese der RA, wird unter der Wirkung genannter Sexualhormone moduliert. Darüber hinaus konnte der in der Literatur beschriebene Zusammenhang zwischen der Stimulation von Zellen über Integrin-vermittelte Signaltransduktionswege und der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen mittels Korrelation nachgewiesen werden.

Die derzeitige Durchführung von Adhäsionsassays mit DHT, dem selektiven GPR30-Agonisten G1 und den Östrogenrezeptoragonisten Propylpyrazoltriol (PPT; $ER\alpha$ -Agonist) und Diarylpropionitril (DPN; $ER\beta$ -Agonist) lässt erkennen, dass insbesondere DHT in den Konzentrationen 10^{-9} M und 10^{-10} M die Adhärenz der synovialen Fibroblasten steigert (Ergebnisse noch nicht veröffentlicht). Da eine vermehrte Adhäsion in diesem Fall mit einer Reduktion der Entzündungsantwort einhergeht, lässt sich auch dieses Ergebnis gut mit der gezeigten antiinflammatorischen Wirkung von DHT bei der RA vereinbaren. Die im Anschluss geplanten Migrations- und Invasionsstudien zum Verhalten synovialer Fibroblasten unter dem Einfluss verschiedener Sexualhormone werden weitere Antworten auf die Frage nach deren Bedeutung für die Degradation von Knorpel und Knochen im Rahmen einer RA liefern.

Literaturverzeichnis

1. Zinkernagel, R.M. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345, 1331-1335 (2001).
2. Pincus, T. & Callahan, L.F. What is the natural history of rheumatoid arthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 19, 123-151 (1993).
3. Goodson, N. & Symmons, D. Rheumatoid arthritis in women: still associated with an increased mortality. *Ann Rheum Dis* 61, 955-956 (2002).
4. Reginster, J.Y. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 41 Supp 1, 3-6 (2002).
5. Kaiser, H. & Keitel, W. [Guillaume de Baillou (1538-1616)--the father of "rheumatism"?]. *Z Rheumatol* 65, 743-746 (2006).
6. Gabriel, S.E. & Michaud, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11, 229 (2009).
7. Young, A., et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford)* 46, 350-357 (2007).
8. Sacks, J.J., Helmick, C.G. & Langmaid, G. Deaths from arthritis and other rheumatic conditions, United States, 1979-1998. *J Rheumatol* 31, 1823-1828 (2004).
9. Gonzalez, A., et al. The widening mortality gap between rheumatoid arthritis patients and the general population. *Arthritis Rheum* 56, 3583-3587 (2007).
10. Sokka, T. Long-term outcomes of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 21, 284-290 (2009).
11. Silman, A.J. & Pearson, J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3, S265-272 (2002).
12. Smith, J.B. & Haynes, M.K. Rheumatoid arthritis--a molecular understanding. *Ann Intern Med* 136, 908-922 (2002).
13. Marrack, P., Kappler, J. & Kotzin, B.L. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 7, 899-905 (2001).
14. Ermann, J. & Fathman, C.G. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat Immunol* 2, 759-761 (2001).
15. Bartok, B. & Firestein, G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233, 233-255 (2010).
16. Guilherme, L. & Kalil, J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. *J Clin Immunol* 30, 17-23 (2010).
17. Firestein, G.S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Kelley's Textbook of Rheumatology* (2008).
18. Hemminki, K., Li, X., Sundquist, J. & Sundquist, K. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum* 60, 661-668 (2009).
19. Padyukov, L., Silva, C., Stolt, P., Alfredsson, L. & Klareskog, L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 3085-3092 (2004).

20. Gay, S., Gay, R.E. & Koopman, W.J. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 52 Suppl 1, S39-47 (1993).
21. Muller-Ladner, U. & Pap, T. [Pathogenesis of RA: more than just immune cells]. *Z Rheumatol* 64, 396-401 (2005).
22. Muller-Ladner, U., Pap, T., Gay, R.E., Neidhart, M. & Gay, S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 1, 102-110 (2005).
23. Tarner, I.H. & Fathman, C.G. Gene therapy in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 13, 676-682 (2001).
24. Feldmann, M., Brennan, F.M. & Maini, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14, 397-440 (1996).
25. Feldmann, M. & Maini, R.N. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38 Suppl 2, 3-7 (1999).
26. Huber, L.C., *et al.* Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45, 669-675 (2006).
27. Firestein, G.S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 39, 1781-1790 (1996).
28. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 392-401 (2006).
29. Buckley, C.D., *et al.* Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 22, 199-204 (2001).
30. Pap, T., Muller-Ladner, U., Gay, R.E. & Gay, S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2, 361-367 (2000).
31. Fassbender, H.G. Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 3, 141-155 (1983).
32. Muller-Ladner, U., *et al.* Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 149, 1607-1615 (1996).
33. Korb, A., Peters, M., Meinecke, I. & Pap, T. [Intracellular signaling pathways of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol* 66, 311-316 (2007).
34. Pap, T., Cinski, A., Baier, A., Gay, S. & Meinecke, I. Modulation of pathways regulating both the invasiveness and apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Joint Bone Spine* 70, 477-479 (2003).
35. Baier, A., Meinecke, I., Gay, S. & Pap, T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15, 274-279 (2003).
36. Matsumoto, S., Muller-Ladner, U., Gay, R.E., Nishioka, K. & Gay, S. Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 23, 1345-1352 (1996).
37. Zhang, H.G., *et al.* Regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by the protein kinase Akt. *Arthritis Rheum* 44, 1555-1567 (2001).
38. Franz, J.K., *et al.* Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 599-607 (2000).
39. Kurowska, M., *et al.* Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in

- autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *J Immunol* 169, 1760-1767 (2002).
40. Perlman, H., *et al.* Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol* 164, 5227-5235 (2000).
 41. Pap, T., Schett, G., Gay, S. Matrix metalloproteinases. (2002).
 42. Lowin, T. & Straub, R.H. Integrins and their ligands in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 13, 244 (2011).
 43. Shattil, S.J., Kim, C. & Ginsberg, M.H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 288-300 (2010).
 44. Abrahamsen, T.G., Froland, S.S., Natvig, J.B. & Pahle, J. Elution and characterization of lymphocytes from rheumatoid inflammatory tissue. *Scand J Immunol* 4, 823-830 (1975).
 45. Seemayer, C.A., *et al.* [Rheumatoid arthritis: new developments in the pathogenesis with special reference to synovial fibroblasts]. *Z Rheumatol* 60, 309-318 (2001).
 46. Schwartz, M.A. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *J Cell Biol* 139, 575-578 (1997).
 47. Fautrel, B. & Bourgeois, P. [Rheumatic disorders. Overview]. *Drugs* 59 Spec No 1, 1-9 (2000).
 48. Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J.P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39, 237-246 (2002).
 49. Sellam, J. & Berenbaum, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6, 625-635 (2010).
 50. Pang, J., Cao, Y.L. & Shi, Y.Y. [Subchondral bone in osteoarthritis: a review]. *Zhongguo Gu Shang* 24, 702-704 (2011).
 51. Goldring, M.B. & Goldring, S.R. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213, 626-634 (2007).
 52. Cutolo, M., *et al.* Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966, 131-142 (2002).
 53. Ford, D.K. Understanding rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24, 1464-1466 (1997).
 54. Cutolo, M. & Accardo, S. Sex hormones, HLA and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 9, 641-646 (1991).
 55. Cutolo, M., Serio, B., Pizzorni, C. & Sulli, A. The role of androgens in rheumatic diseases. *Isr Med Assoc J* 3, 743-748 (2001).
 56. Cutolo, M., Sulli, A., Serio, B., Accardo, S. & Masi, A.T. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 13, 217-226 (1995).
 57. Cutolo, M. & Straub, R.H. Recent aspects of gonadal hormone and neurotransmitter interactions with synovial and immune cells: implications in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 59, 657-661 (2000).
 58. Cutolo, M. & Wilder, R.L. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 26, 825-839 (2000).
 59. Bijlsma, J.W., Masi, A., Straub, R.H., Lahita, R. & Cutolo, M. Neuroendocrine immune system involvement in rheumatology. *Ann N Y Acad Sci* 1069, xviii-xxiv (2006).

60. Olsen, N.J. & Kovacs, W.J. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 17, 369-384 (1996).
61. Tengstrand, B., Carlstrom, K., Fellander-Tsai, L. & Hafstrom, I. Abnormal levels of serum dehydroepiandrosterone, estrone, and estradiol in men with rheumatoid arthritis: high correlation between serum estradiol and current degree of inflammation. *J Rheumatol* 30, 2338-2343 (2003).
62. Kuiper, S., *et al.* Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28, 1809-1816 (2001).
63. Cutolo, M., Straub, R.H. & Bijlsma, J.W. Neuroendocrine-immune interactions in synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 627-634 (2007).
64. Forslind, K., Hafstrom, I., Ahlmen, M. & Svensson, B. Sex: a major predictor of remission in early rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 66, 46-52 (2007).
65. Cutolo, M. The roles of steroid hormones in arthritis. *Br J Rheumatol* 37, 597-599 (1998).
66. Cutolo, M., Capellino, S. & Straub, R.H. Oestrogens in rheumatic diseases: friend or foe? *Rheumatology (Oxford)* 47 Suppl 3, iii2-5 (2008).
67. Cutolo, M., *et al.* Altered circadian rhythms in rheumatoid arthritis patients play a role in the disease's symptoms. *Autoimmun Rev* 4, 497-502 (2005).
68. Cutolo, M., Otsa, K., Aakre, O. & Sulli, A. Nocturnal hormones and clinical rhythms in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 372-381 (2005).
69. Straub, R.H., Buttgereit, F. & Cutolo, M. Benefit of pregnancy in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 801-803 (2005).
70. Bijlsma, J.W. & Van den Brink, H.R. Estrogens and rheumatoid arthritis. *Am J Reprod Immunol* 28, 231-234 (1992).
71. Castagnetta, L., *et al.* Endocrine end-points in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 876, 180-191; discussion 191-182 (1999).
72. Castagnetta, L.A., *et al.* Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30, 2597-2605 (2003).
73. Bijlsma, J.W., Straub, R.H., Masi, A.T., Lahita, R.G. & Cutolo, M. Neuroendocrine immune mechanisms in rheumatic diseases. *Trends Immunol* 23, 59-61 (2002).
74. Gordon, D., Beastall, G.H., Thomson, J.A. & Sturrock, R.D. Prolonged hypogonadism in male patients with rheumatoid arthritis during flares in disease activity. *Br J Rheumatol* 27, 440-444 (1988).
75. Cutolo, M. Androgens in rheumatoid arthritis: when are they effectors? *Arthritis Res Ther* 11, 126 (2009).
76. Cutolo, M., *et al.* Anti-TNF and sex hormones. *Ann N Y Acad Sci* 1069, 391-400 (2006).
77. Capellino, S., *et al.* Quantitative determination of steroid hormone receptor positive cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: is there a link to inflammation? *Ann Rheum Dis* 66, 53-58 (2007).
78. Cutolo, M., *et al.* Synovial fluid estrogens in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 3, 193-198 (2004).
79. Macdiarmid, F., *et al.* Stimulation of aromatase activity in breast fibroblasts by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Endocrinol* 106, 17-21 (1994).

80. Purohit, A., *et al.* Aromatase activity and interleukin-6 production by normal and malignant breast tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3052-3058 (1995).
81. Schmidt, M., *et al.* Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Res Ther* 7, R938-948 (2005).
82. Cutolo, M., *et al.* Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1089, 538-547 (2006).
83. Straub, R.H. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 28, 521-574 (2007).
84. Cutolo, M., *et al.* The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1193, 36-42 (2010).
85. Straub, R.H. Tables of molecular and functional neuroendocrine immune interactions. (2000).
86. Cutolo, M. Estrogen metabolites: increasing evidence for their role in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 31, 419-421 (2004).
87. Cutolo, M., *et al.* Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Res Ther* 7, R1124-1132 (2005).
88. Cutolo, M., *et al.* Circadian melatonin and cortisol levels in rheumatoid arthritis patients in winter time: a north and south Europe comparison. *Ann Rheum Dis* 64, 212-216 (2005).
89. Itoh, Y., *et al.* Dihydrotestosterone inhibits tumor necrosis factor alpha induced interleukin-1alpha mRNA expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells. *Biol Pharm Bull* 30, 1140-1143 (2007).
90. Xu, J., *et al.* Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1alpha or tumor necrosis factor alpha-induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor-kappaB activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line. *Biol Pharm Bull* 34, 1724-1730 (2011).
91. Cutolo, M. & Straub, R.H. Insights into endocrine-immunological disturbances in autoimmunity and their impact on treatment. *Arthritis Res Ther* 11, 218 (2009).
92. Cutolo, M. & Straub, R.H. Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* 13, 277-282 (2006).
93. Cutolo, M., Balleari, E., Giusti, M., Intra, E. & Accardo, S. Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34, 1-5 (1991).
94. Kelder, J., *et al.* Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and to nuclear progesterone receptor: correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPRalpha-specific agonists. *Steroids* 75, 314-322 (2010).
95. Thomas, P. Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. *Front Neuroendocrinol* 29, 292-312 (2008).

96. Schindler, A.E., *et al.* Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 61, 171-180 (2008).
97. Flammer, J.R. & Rogatsky, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Mol Endocrinol* 25, 1075-1086 (2011).
98. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T. & Ito, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 63, 601-610 (2010).
99. Munoz-Cruz, S., Togno-Pierce, C. & Morales-Montor, J. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Curr Top Med Chem* 11, 1714-1727 (2011).
100. Yudoh, K., Matsuno, H., Nakazawa, F., Yonezawa, T. & Kimura, T. Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 617-627 (2000).
101. Dolhain, R.J., van der Heiden, A.N., ter Haar, N.T., Breedveld, F.C. & Miltenburg, A.M. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39, 1961-1969 (1996).
102. Morita, Y., *et al.* Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41, 1669-1676 (1998).
103. Marzi, M., *et al.* Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 106, 127-133 (1996).
104. Piccinni, M.P., *et al.* Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155, 128-133 (1995).
105. Hughes, G.C. Progesterone and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* (2011).
106. Calabrese, E.J. Estrogen and related compounds: biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol* 31, 503-515 (2001).
107. Barrett, J.H., Brennan, P., Fiddler, M. & Silman, A. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 1010-1015 (2000).
108. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1950/henck-lecture.html.
109. Kanik, K.S. & Wilder, R.L. Hormonal alterations in rheumatoid arthritis, including the effects of pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am* 26, 805-823 (2000).
110. Zang, Y.C., Halder, J.B., Hong, J., Rivera, V.M. & Zhang, J.Z. Regulatory effects of estriol on T cell migration and cytokine profile: inhibition of transcription factor NF-kappa B. *J Neuroimmunol* 124, 106-114 (2002).
111. Sicotte, N.L., *et al.* Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol* 52, 421-428 (2002).
112. Prossnitz, E.R., *et al.* Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 70, 165-190 (2008).
113. Jenkins, E.V., *et al.* Estrogen-receptor interactions. *Science* 182, 126-134 (1973).

114. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925-5930 (1996).
115. Prossnitz, E.R., Oprea, T.I., Sklar, L.A. & Arterburn, J.B. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 350-353 (2008).
116. Kelly, M.J. & Levin, E.R. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12, 152-156 (2001).
117. Wyckoff, M.H., *et al.* Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through G α (i). *J Biol Chem* 276, 27071-27076 (2001).
118. Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B. & Prossnitz, E.R. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630 (2005).
119. Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J. & Dong, J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632 (2005).
120. Blasko, E., *et al.* Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 214, 67-77 (2009).
121. Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I. & Frackelton, A.R., Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14, 1649-1660 (2000).
122. Filardo, E.J., Quinn, J.A. & Sabo, E. Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Steroids* 73, 870-873 (2008).
123. Mihara M., H., M., Yoshida, H., Suzuki, M., Shiina, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 122, 143-159 (2012).
124. Sack, U., *et al.* Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 13, 45-51 (1993).
125. Madhok, R., Crilly, A., Watson, J. & Capell, H.A. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 52, 232-234 (1993).
126. Hirano, T., *et al.* Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-76 (1986).
127. Papanicolaou, D.A., *et al.* Exercise stimulates interleukin-6 secretion: inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines. *Am J Physiol* 271, E601-605 (1996).
128. Breuninger, L.M., Dempsey, W.L., Uhl, J. & Murasko, D.M. Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 69, 205-214 (1993).
129. Girasole, G., *et al.* 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 89, 883-891 (1992).

130. Straub, R.H., *et al.* Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1340-1344 (2000).
131. Fonseca, J.E., Santos, M.J., Canhao, H. & Choy, E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 8, 538-542 (2009).
132. Dayer, J.M. & Choy, E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)* 49, 15-24 (2010).
133. Kallen, K.J. The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1592, 323-343 (2002).
134. Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54, 1-78 (1993).
135. Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A. & Farnarier, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24, 25-29 (2003).
136. Kotake, S., *et al.* Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* 11, 88-95 (1996).
137. Tamura, T., *et al.* Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11924-11928 (1993).
138. Ballara, S., *et al.* Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 44, 2055-2064 (2001).
139. Sone, H., *et al.* Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity. *Life Sci* 69, 1861-1869 (2001).
140. Muraguchi, A., *et al.* The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 167, 332-344 (1988).
141. Castell, J.V., *et al.* Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* 232, 347-350 (1988).
142. Ishibashi, T., *et al.* Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 74, 1241-1244 (1989).
143. Nemeth, E., *et al.* IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113, 1271-1276 (2004).
144. Ganz, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102, 783-788 (2003).
145. Davis, M.C., *et al.* Chronic stress and regulation of cellular markers of inflammation in rheumatoid arthritis: implications for fatigue. *Brain Behav Immun* 22, 24-32 (2008).
146. Nishimoto, N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 18, 277-281 (2006).
147. Nishimoto, N., *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 50, 1761-1769 (2004).

148. Arnett, F.C., *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31, 315-324 (1988).
149. Neumann, E., *et al.* Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 12, R83 (2010).
150. Schneider, J., Huh, M.M., Bradlow, H.L. & Fishman, J. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 259, 4840-4845 (1984).
151. Swaneck, G.E. & Fishman, J. Covalent binding of the endogenous estrogen 16 alpha-hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7831-7835 (1988).
152. Telang, N.T., Suto, A., Wong, G.Y., Osborne, M.P. & Bradlow, H.L. Induction by estrogen metabolite 16 alpha-hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 84, 634-638 (1992).
153. Schmidt, M., *et al.* Inflammation and sex hormone metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1069, 236-246 (2006).
154. Straub, R.H. & Besedovsky, H.O. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J* 17, 2176-2183 (2003).
155. Rinaldi, N., Barth, T., Henne, C., Mechterscheimer, G. & Moller, P. Synoviocytes in chronic synovitis in situ and cytokine stimulated synovial cells in vitro neo-express alpha 1, alpha 3 and alpha 5 chains of beta 1 integrins. *Virchows Arch* 425, 171-180 (1994).
156. el Gabalawy, H. & Wilkins, J. Beta 1 (CD29) integrin expression in rheumatoid synovial membranes: an immunohistologic study of distribution patterns. *J Rheumatol* 20, 231-237 (1993).
157. Lowin, T., *et al.* Glucocorticoids increase alpha5 integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion. *Arthritis Rheum* 60, 3623-3632 (2009).
158. Zutter, M.M., Santoro, S.A., Staatz, W.D. & Tsung, Y.L. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7411-7415 (1995).
159. Yasuda, T. Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol* 16, 197-205 (2006).
160. Kitagawa, A., *et al.* Anchorage on fibronectin via VLA-5 (alpha5beta1 integrin) protects rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis. *Ann Rheum Dis* 65, 721-727 (2006).
161. Alsaleh, G., *et al.* Synovial fibroblasts promote immunoglobulin class switching by a mechanism involving BAFF. *Eur J Immunol* 41, 2113-2122 (2011).
162. Rinaldi, N. & Schwarz-Eywill, M. [Molecular mechanisms of cell-cell and cell-matrix interactions in the pathophysiology of rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol* 58, 333-344 (1999).
163. Jacq, L., *et al.* The ITGAV rs3738919-C allele is associated with rheumatoid arthritis in the European Caucasian population: a family-based study. *Arthritis Res Ther* 9, R63 (2007).

164. Charo, I.F., Nannizzi, L., Smith, J.W. & Cheresch, D.A. The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin. *J Cell Biol* 111, 2795-2800 (1990).
165. Horton, M.A. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int J Biochem Cell Biol* 29, 721-725 (1997).
166. Nakamura, I., Duong le, T., Rodan, S.B. & Rodan, G.A. Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab* 25, 337-344 (2007).
167. Teitelbaum, S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508 (2000).
168. Goldring, S.R. & Gravallesse, E.M. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 12, 195-199 (2000).
169. Koch, A.E. The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent developments. *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1, i65-71 (2000).
170. Rinaldi, N., *et al.* Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann Rheum Dis* 56, 45-51 (1997).
171. Wang, A.Z., Wang, J.C., Fisher, G.W. & Diamond, H.S. Interleukin-1beta-stimulated invasion of articular cartilage by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by antibodies to specific integrin receptors and by collagenase inhibitors. *Arthritis Rheum* 40, 1298-1307 (1997).
172. Nakayamada, S., *et al.* beta1 integrin-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and Fas on rheumatoid synovial cells and Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum* 48, 1239-1248 (2003).
173. Yang, L., *et al.* ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106, 584-592 (2005).
174. Gitter, B.D., Labus, J.M., Lees, S.L. & Scheetz, M.E. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology* 66, 196-200 (1989).
175. Pirila, L. & Heino, J. Altered integrin expression in rheumatoid synovial lining type B cells: in vitro cytokine regulation of alpha 1 beta 1, alpha 6 beta 1, and alpha v beta 5 integrins. *J Rheumatol* 23, 1691-1698 (1996).
176. Gailit, J., Xu, J., Bueller, H. & Clark, R.A. Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins alpha 1 beta 1 and alpha 5 beta 1 by human dermal fibroblasts in vitro. *J Cell Physiol* 169, 281-289 (1996).
177. Georganas, C., *et al.* Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J Immunol* 165, 7199-7206 (2000).
178. Werb, Z., Tremble, P.M., Behrendtsen, O., Crowley, E. & Damsky, C.H. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol* 109, 877-889 (1989).
179. Sarkissian, M. & Lafyatis, R. Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 162, 1772-1779 (1999).
180. Attur, M.G., *et al.* Functional genomic analysis in arthritis-affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins. *J Immunol* 164, 2684-2691 (2000).

181. Gladson, C.L. & Cheresh, D.A. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 88, 1924-1932 (1991).
182. Liapis, H., Adler, L.M., Wick, M.R. & Rader, J.S. Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 28, 443-449 (1997).
183. Brooks, P.C., *et al.* Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 96, 1815-1822 (1995).
184. Felding-Habermann, B., *et al.* Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1853-1858 (2001).
185. Seftor, R.E., *et al.* Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1557-1561 (1992).
186. Nip, J., Shibata, H., Loskutoff, D.J., Cheresh, D.A. & Brodt, P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin alpha v beta 3 to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest* 90, 1406-1413 (1992).
187. Albelda, S.M., *et al.* Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50, 6757-6764 (1990).
188. Hieken, T.J., *et al.* Beta3 integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis. *J Surg Res* 63, 169-173 (1996).
189. Wilder, R.L. Integrin alpha V beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2, ii96-99 (2002).
190. Schneider, M., *et al.* Basement membrane proteins in synovial membrane: distribution in rheumatoid arthritis and synthesis by fibroblast-like cells. *Clin Rheumatol* 13, 90-97 (1994).
191. Hoberg, M., *et al.* Attachment to laminin-111 facilitates transforming growth factor beta-induced expression of matrix metalloproteinase-3 in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 66, 446-451 (2007).
192. Fukushima, Y., Ohnishi, T., Arita, N., Hayakawa, T. & Sekiguchi, K. Integrin alpha3beta1-mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells. *Int J Cancer* 76, 63-72 (1998).
193. Ura, H., Denno, R., Hirata, K., Yamaguchi, K. & Yasoshima, T. Separate functions of alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins in the metastatic process of human gastric carcinoma. *Surg Today* 28, 1001-1006 (1998).
194. Sugiura, T. & Berditchevski, F. Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J Cell Biol* 146, 1375-1389 (1999).
195. Giannelli, G., *et al.* Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin. *Am J Pathol* 161, 183-193 (2002).
196. Cutolo, M., Picasso, M., Ponassi, M., Sun, M.Z. & Balza, E. Tenascin and fibronectin distribution in human normal and pathological synovium. *J Rheumatol* 19, 1439-1447 (1992).

197. Elices, M.J., *et al.* Expression and functional significance of alternatively spliced CS1 fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature. *J Clin Invest* 93, 405-416 (1994).
198. Zeisel, M.B., Druet, V.A., Wachsmann, D. & Sibilia, J. MMP-3 expression and release by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes induced with a bacterial ligand of integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Arthritis Res Ther* 7, R118-126 (2005).
199. Yao, E.S., *et al.* Increased $\beta 1$ integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res* 67, 659-664 (2007).
200. Cioffi, M., *et al.* Cytokine pattern in postmenopause. *Maturitas* 41, 187-192 (2002).
201. Rachon, D., Mysliwska, J., Suchecka-Rachon, K., Wieckiewicz, J. & Mysliwski, A. Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *J Endocrinol* 172, 387-395 (2002).
202. Rogers, A. & Eastell, R. Effects of estrogen therapy of postmenopausal women on cytokines measured in peripheral blood. *J Bone Miner Res* 13, 1577-1586 (1998).

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Katharina Weiß, geboren am 18.03.1985 in Regensburg erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 01.12.2012

Katharina Weiß

Danksagung

Mein Dank geht an alle, die mich während meiner Promotion unterstützt haben, im Besonderen an:

Dr. Torsten Lowin: Für die Betreuung und Korrektur meiner Dissertation, die intensive, kritische und stetige Beratung bei der Erstellung der Arbeit, außerdem so manche hilfreiche Anregung und ein immer offenes Ohr.

Dagmar Halbritter und Olga Wiesner: Für die gute Zusammenarbeit und kompetente Unterstützung während der experimentellen Arbeiten.

Prof. Dr. Rainer H. Straub: Für die Überlassung des Themas, die gute Kooperation und große Unterstützung sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

